Aus dem Institut für Humangenetik und Anthropologie
der Universität Düsseldorf
(Direktor: Prof.Dr.G. Röhrborn)

Färbetechniken für die Pipettenmethode

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf
vorgelegt von
Marianne S c h m i d t

1983

Aus dem Institut für Humangenetik und Anthropologie
der Universität Düsseldorf
(Direktor: Prof.Dr.G. Röhrborn)

Färbetechniken für die Pipettenmethode

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf
vorgelegt von
Marianne S c h m i d t

1983

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

gez.: Prof.Dr.med.
H. Brüster

Referent
gez.:
Priv.Doz.Dr. Claussen

Korreferent
gez.:
Priv.Doz. Dr. Terinde

Meinen lieben

Eltern gewidmet

GLIEDERUNG Seite

1. EINLEITUNG 6

1.1. Präparationsmethoden in der Pränatal-diagnostik 6

1.2. Bänderungstechniken im geschichtlichen Überblick 6

1.2.1. Postnatal 6
1.2.2. Pränatal 9

2. PROBLEMSTELLUNG 11

Abhängigkeit der Bänderungstechnik von der Präparationsmethode

2.1. Die "in situ" Technik 11

2.2. Die "Trypsinierungstechnik" 12

2.3. Die "Pipettenmethode" 13

3. EIGENE VERSUCHE 15

4. MATERIAL und METHODE 16

4.1. Präparateherstellung nach der "Pipettenmethode" 16

4.2. Bänderungstechniken nach Aufarbeitung mit der "Pipettenmethode" 18

4.2.1. G-banding 18
4.2.2. C-banding 19
4.2.3. CT/T-banding 21
4.2.4. NOR-Darstellung 22
4.2.5. R-banding 23

4.2.5.1. Acridin-Orange Färbetechnik 23

4.2.5.1.1. Methotrexat und BrdU 23
4.2.5.1.2. Acridin-Orange 24

4.2.5.2. Färbung mit Chromomycin und Gegenfärbung mit Methylgrün 26

4.2.6. Q-banding 27

5. E R G E B N I S S E 28

5.1. Präparateherstellung nach der "Pipettenmethode" 28
5.2. Bänderungstechniken nach Aufarbeitung der "Pipettenmethode" 28

5.2.1. G-banding 28
5.2.2. C-banding 34
5.2.3. CT/T-banding 37
5.2.4. NOR-Darstellung 43
5.2.5. R-banding 47

5.2.5.1. Acridin-Orange Färbetechnik 47

5.2.5.1.1. Methotrexat und BrdU 47
5.2.5.1.2. Acridin-Orange 49

5.2.5.2. Färbung mit Chromomycin und Gegenfärbung mit Methylgrün 54

5.2.6. Q-banding 59

6. D I S K U S S I O N 61

6.1. Präparateherstellung nach der "Pipettenmethode" 61
6.2. Bänderungstechniken nach Aufarbeitung mit der "Pipettenmethode" 62

6.2.1. G-banding 62
6.2.2. C-banding 66
6.2.3. CT/T-banding 68
6.2.4. NOR-Darstellung 71
6.2.5. R-banding 75

6.2.5.1. Acridin-Orange Färbetechnik 75
6.2.5.1.1. Methotrexat und BrdU 75
6.2.5.1.2. Acridin-Orange 77

6.2.5.2. Färbung mit Chromomycin und Gegenfärbung mit Methylgrün 8o

6.2.6. Q-banding 82

6.3. Zusammenfassende Beurteilung der Bänderungstechniken nach Aufarbeitung mit der "Pipettenmethode" 85
6.4. Zusammenfassende Bewertung der "Pipettenmethode im Vergleich zur "Trypsinierungstechnik und zur "in situ" Technik 86

7. Z U S A M M E N F A S S U N G 88

8. L I T E R A T U R 92

1. E I N L E I T U N G

1.1. Präparationsmethoden in der Pränataldiagnostik

Die Pränataldiagnostik ist zu einem wesentlichen Bestandteil der genetischen Familienberatung geworden. Mit der Amniozentese, meist in der 16. Schwangerschaftswoche durchgeführt, werden foetale Zellen gewonnen. Diese werden kultiviert und nach ausreichendem Wachstum zur Chromosomenanalyse aufgearbeitet. Hierzu stehen drei Methoden zur Verfügung:

1. Die "in situ" Technik
2. Die "Trypsinierungstechnik"
3. Die "Pipettenmethode"

Die "Pipettenmethode", 1980 von CLAUSSEN entwickelt, zeichnet sich vor allem durch die schnellere Diagnostik aus. Man braucht durchschnittlich 6,9 Tage (STUTZ, 1983). Demgegenüber benötigt man bei einem Vergleich zahlreicher europäischer Institute für die "in situ" Technik 13,4 Tage und für die "Trypsinierungstechnik" 15,7 Tage (THERKELSEN, 1979). In der vorliegenden Arbeit werden die gängigen Bänderungstechniken an die "Pipettenmethode" adaptiert.

1.2. Bänderungstechniken im geschichtlichen Überblick

In den letzten Jahren haben sich die Methoden zur Durchführung von Chromosomenuntersuchungen grundlegend geändert. Früher war nur eine grobe Klassifizierung der Chromosomen in Gruppen (A - G) möglich. Heute kann durch Anwendung differentieller Färbeverfahren jedes einzelne Chromosom aufgrund eines bestimmten Bandenmusters identifiziert werden.

1.2.1. Postnatal

1956 erkannten TJIO und LEVAN aus Untersuchungen an foetalen Zellen, daß der menschliche Chromosomensatz 46 und nicht 48 Chromosomen umfaßte. Dies wurde von

FORD und HAMERTON (1956) bestätigt, die ihr Zellmaterial aus Hodengewebe gewonnen hatten.
1960 waren MOORHEAD et al. zu einem befriedigenden Ergebnis bezüglich der Kultivierung von Leukozyten gekommen. Hinreichendes Ausgangsmaterial war die Voraussetzung für Serienversuche.
Das Interesse in die Zytogenetik war soweit gewachsen, daß im gleichen Jahr 17 Arbeitsgruppen aus aller Welt in DENVER erstmals ihre Ergebnisse zusammentrugen. Sie schlugen ein "STANDARD SYSTEM OF NOMENCLATUR OF HUMAN MITOTIC CHROMOSOMES" vor.
Man färbte damals mit konventionellen Kernfarbstoffen (z.B. Orcein, Giemsa und Trypanblau). Die durch Colchizin im Stadium der Metaphase arretierten Zellen stammten zumeist aus Lymphozytenkulturen. Die homogen angefärbten Chromosomen konnten auf numerische und durch Karyotypisierung auf grobe strukturelle Anomalien hin untersucht werden.
Zur Herstellung eines Karyogramms wurden die Chromosomen ausgeschnitten und nach Größe und Armverhältnis in 7 Gruppen (A - G) geordnet (LONDON CONFERENCE, 1963).

Mit Hilfe dieser non-banding Techniken konnte eine kleine Zahl von chromosomal bedingten Mißbildungen diagnostiziert werden (Trisomie D = Patau - Syndrom, Trisomie E = Edwards - Syndrom, Trisomie G = Down - Syndrom), (STENGEL - RUTKOWSKI, 1976, MOORHEAD et al., 1960).

Durch diese Bestimmung des Barrschen Körperchen in Interphasekernen der Mundschleimhaut konnten überzählige oder fehlende Chromosomen in der C-Gruppe als X-chromosomale Abeerrationen identifiziert werden (XO = Turner-Syndrom, XXY, XXXY etc. = Klinefelter-Syndrom).

Erst 8 Jahre später gelang der entscheidende Fortschritt:

1968 erzielten CASPERSSON et al. mit Quinacrin Mustard ein banding-Muster bei Pflanzenchromosomen. 197o veröffentlichte die Arbeitsgruppe um CASPERSSON und ZECH den ersten gebänderten menschlichen Karyotyp.
Die deutlich unterscheidbaren fluoreszierenden Banden ergaben ein charakteristisches Muster, daß als Q-Banden bezeichnet wurde. Die Existenz von bisher ungeahnten chromosomalen Substrukturen war damit bewiesen.
1971 entdeckten ARRIGHI und HSU ein Färbeverfahren, das die Zentromerregion aller Chromosomen stark anfärbte, während die übrigen Abschnitte hell blieben. Besonders ausgeprägt zeigten sich diese C-Banden an den Chromosomen 1, 9, 16 und Y.
Von diesen Versuchen leiteten sich die Methoden zur G-Bandendarstellung ab. Sie entstanden durch differentielles Anfärben der Chromosomen mit Thiazinfarbstoffen (z.B. Giemsa oder Leishmann). Bis auf wenige Ausnahmen (Polymorphismen am Chromosom 1, 9 und 16, Chromosomen der D- und G-Gruppe) erwiesen sich die Giemsa-Banden als mit den Q-Banden identisch (PARIS CONFERENCE, 1971).
Die im Fluoreszenzmikroskop hell leuchtenden Banden waren beim G-banding dunkel, die dunklen Anschnitte hell.
Weitere speziellere Bandentechniken kamen hinzu:
1971 die Reverse - Bandentechnik von DUTRILLAUX mit einem Bandenmuster, das sich als Spiegelbild der G-Banden herausgestellt hat: Die dunklen Areale sind hell, die hellen dunkel.
1973 die Telomer-Bandentechnik von DUTRILLAUX, bei der die terminalen Enden der Chromosomen differentiell gefärbt werden.
Im gleichen Jahr gelang die Darstellung der "Nucleolus Organisator Regions". Sie wurden 1973 mit der sogenannten "N-banding" Methode von MATSUI und SASAHI, 1975

mit der Silbermethode von GOODPASTURE und BLOOM markiert.
Beträchtliche Bedeutung erlangte das Verfahren mit Hilfe des Zytostatikums Methotrexat und des Thymidinanalogons BrdU, eine Zellsynchronisation zu erreichen (siehe STUBBLEFIELD, 1968 und MUELLER, 1971).
Um dem Fortschritt in der Zytogenetik zu genügen, wurde 1971 in Paris eine Standardnomenklatur für die gebänderten Chromosomen festgelegt (PARIS CONFERENCE, 1971). Sie wurde 1975 (SUPPLEMENT) und 1978 (ISCN) ergänzt.

1.2.2. Pränatal

1966 (STEELE und BREG) und 1967 (JACOBSON und BARTER) erschienen die ersten Berichte über Chromosomenuntersuchungen an foetalen Zellen. Gefärbt wurde mit konventionellen Farbstoffen.
Die 1971 auf der PARIS CONFERENCE beschriebenen banding-Techniken waren an postnatal gewonnenen Lymphozyten entwickelt worden. Durch Variationen innerhalb der jeweiligen banding-Techniken konnte man in der Regel auch die Chromosomenstruktur anderer Zellen (z.B. Knochenmarkzellen, Leukozyten) darstellen. Das galt jedoch nur für den postnatalen Bereich.
Nunmehr wollte man diese differentiellen Färbeverfahren auch in der pränatalen Diagnostik einsetzen. Doch ergaben sich Schwierigkeiten: man steht unter dauerndem Zeitdruck, die Diagnosen müssen schnell erfolgen. Da die Amnionzellkultivierung problematisch war, blieb das Ausgangsmaterial begrenzt. So waren Serienversuche nur sehr schwierig zu bewerkstelligen. Das Problem der Amnionzellkultivierung wurde erst 197o von NADLER und GERBIE allmählich gelöst. Der Wert der Banden-Darstellung in der Routinediagnostik war zudem nicht voll erkannt worden.
Bis Anfang 197o herrschten non banding-Techniken vor (z.B. Orcein, Giemsa und Methylblau),ehe die Quinacrin-Färbetechnik eingeführt wurde. 1975 galt sie als beste

und sicherste Methode (ALFI et al., 1975).
Noch im gleichen Jahr erschienen Arbeiten über das Giemsa- und C-banding im pränatalen Bereich (BURKHOLDER, 1975, EPPLEN et al., 1975).
1978 wurde über Versuche mit BrdU zur Synchronisation von Amnionzellen und Reverse-banding berichtet (siehe W. SCHEMPP, VOGEL, 1978).
Heute können morphologisch selbst feinste chromosomale Veränderungen nachgewiesen werden. So manche Anomalie, deren Ursache bislang unbekannt war, kann nun als chromosomal bedingt erkannt werden (STENGEL-RUTKOWSKI, 1976).

2. P R O B L E M S T E L L U N G

Abhängigkeit der Bänderungstechnik von der Präparationsmethode

Obwohl ein Großteil der banding-Techniken schon 1971 (PARIS CONFERENCE) bekannt war, konnte man sie in der zytogenetischen Diagnostik nur begrenzt einsetzen. Die damaligen Verfahren waren zu zeit- und materialaufwendig, die Qualität der Bänderung zu ungleichmäßig. Dies stand im Widerspruch zu dem Ziel einer möglichst schnellen und verläßlichen pränatalen Diagnostik.

Inzwischen können in den meisten humangenetischen Instituten auch im pränatalen Bereich alle bekannten banding-Techniken eingesetzt werden.

Zu Anfang bereitete es regelmäßig Schwierigkeiten, die anhand von peripheren Blutzellen gewonnenen Daten auf die anders reagierenden Amnionzellen zu übertragen. Selbst die unterschiedlichen Aufarbeitungsmethoden bedingen z.T. erhebliche Abweichungen innerhalb derselben banding-Technik. Im Falle des Giemsa-banding z.B. ist die Trypsinierungszeit bei der "Pipettenmethode" wesentlich kürzer als bei der "Trypsinierungstechnik", Der wesentliche Grund dafür liegt in den verschiedenen Fixationsgeschwindigkeiten und der unterschiedlichen Fixationsdauer.

2.1. Die "in situ" Technik

Die foetalen Zellen werden auf Deckgläschen in einem Kulturgefäß kultiviert und nach einer gewissen Wachstumszeit "in situ", i.e. ohne Zustandsänderung, aufgearbeitet.
Zunächst gibt man Colcemid-Lösung (o,1 - o,3 ug/ml) für ca. 2 Stunden auf die Kultur. Das Medium wird dann entfernt und der hypotone Schock (z.B. o,o75 molare KCL-Lösung, 37 C, 15 Minuten) angeschlossen.

Nach der Fixation (z.B. mit einem Methanol-Eisessig Gemisch im Verhältnis 3+1) nimmt man die Deckgläschen aus dem Kulturgefäß. Man legt sie auf Objektträger, färbt und mikroskopiert.
Diese Methode bietet den Vorteil, daß jede Metaphase ihrem morphologisch definierten Klan zugeordnet werden kann. Eventuelle präparative Artefakte und in Kultur entstandene chromosomale Veränderungen (Kultureffekte) können so gegenüber tatsächlich pathologischen Chromosomenkonstellationen abgegrenzt werden (SCHMID, 1975 und 1977).
Folgende Nachteile sind zu nennen:
Die nach der "in situ" Technik einmal abgebrochene Kultur ist für immer verloren, weil das gesamte Zellmaterial mit abgetötet wird.
Die hohe Zelldichte in Primärkulturen beeinträchtigt qualitativ jede banding-Technik. Durch Subkultivierung kann die Zelldichte jedoch verringert werden. Doch damit entfiele der obengenannte Vorteil, das nämlich jede Metaphase ihrem Ursprungs-Klan zugeordnet werden kann.

2.2. Die "Trypsinierungstechnik"

Man wartet ab, bis die foetalen Zellen auf dem Boden eines Kulturgefäßes (z.B. eine Flasche oder Petri-Schale) ausreichend gewachsen sind. Die Klone werden ca. 2 Stunden mit Colcemid-Lösung (o,1 - o,3 ug/ml) inkubiert. Dann löst man die Klone enzymatisch (z.B. mit Trypsin-EDTA) vom Boden ab und füllt sie in ein Reagenzglas um. Danach folgt der hypotone Schock und die Fixation (s. 2.1.). Das aufgearbeitete Zellmaterial wird auf die Objektträger aufgetropft, gefärbt, eingedeckt und mikroskopiert.

Verglichen mit der "in situ" Technik ist diese Methode weniger aufwendig. Durch den Auftropfungsvorgang wird eine bessere Spreitung der Chromosomen erzielt. Daher ist es möglich, nach der jeweiligen Adaption

der verschiedenen banding-Verfahren, alle bekannten Chromosomenbanden darzustellen.

Folgende Nachteile sind zu nennen:
Es fehlt die Möglichkeit der Zuordnung von untersuchten Metaphasen zu ihrem Ursprungsklon. Nach dem Abbruch ist das Zellmaterial wie bei der "in situ" Technik verloren.

Im Vergleich mit der "in situ" Technik besteht eine erhöhte Rate an numerischen und strukturellen Chromosomenanomalien, ebenso wie eine durchschnittlich längere Wachstumszeit (HOEHN, 1974, THERKELSEN, 1979).

2.3. Die "Pipettenmethode"

Man läßt die foetalen Zellen in Petri-Schalen wachsen. Sobald Mitosen zu sehen sind (runde Zellen mit scharf konturiertem Rand), wird Colcemid-Lösung (o,3 ug/ml) hinzugefügt. Nach ca. 2 Stunden werden die Mitosen mit einer Mikropipette und einem Mikromanipulator unter Sichtkontrolle (Invertoskop) aufgesogen und in eine Petri-Schale mit hypotoner Lösung (z.B. eine o,o75 molare KCL-Lösung, 37 C, 15 Minuten) überführt. Mit der gleichen Pipette saugt man zuerst die Mitosen und dann die Fixationslösung (z.B. ein Methanol-Eisessig Gemisch, 3+1, 4 C) auf. Anschließend tropft man die Zellen auf Objektträger auf, färbt, deckelt ein und mikroskopiert.
Der entscheidende Vorteil deser Methode liegt in der Zeit- und Materialersparnis:
Sobald die ersten Mitosen zu sehen sind, u.U. bereits nach 4 Tagen (STUTZ, 1983) kann man ohne großen technischen Aufwand mit der Aufarbeitung beginnen.
Die Kultur wächst anschließend nach zweimaligem Mediumwechsel ungestört weiter. Es geht also praktisch kein Zellmaterial verloren.

Wie bei der "in situ" Technik kann jede untersuchte Metaphase ihrem bestimmten Klon zugeordnet werden.

Folgende Nachteile sind zu nennen:
Eine eventuelle Ungeschicklichkeit des Bearbeiters wird sich bei der "Pipettiermethode" besonders nachteilig auswirken, da das Ausgangsmaterial von vornherein gering ist.
Es muß ein Zeitverlust hingenommen werden, wenn bei einer einzigen Metaphase diese, abweichend vom Regelfall, nicht in der Mitte des Kreises liegt, der den Tropfen auf dem Objektträger kennzeichnet. Das bedeutet, daß man u.U. den ganzen Kreis unter einem Phasenkontrastmikroskop absuchen muß.
Die bekannten banding-Techniken konnten bisher nicht eingesetzt werden. Einzelne Versuche herkömmliche banding-Methoden anzuwenden, scheiterten an der Reaktionsweise der Chromosomen. Offenbar verlangt die durch die "Pipettenmethode" bedingte äußerst kurze Zeit der Fixation eine z.T. beträchtliche Modifikation dieser banding-Verfahren.

Die Anpassung aller für die Routinediagnostik notwendigen Färbeverfahren an die "Pipettenmethode" ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit.
Die Problematik besteht zunächst in der Auswahl derjenigen Methode innerhalb einer banding-Technik, die am ehesten für die "Pipettenmethode" geeignet erscheint. Zu diesem Zwecke werden einige Probeversuche durchgeführt. Über Serienversuche werden die einzelnen Parameter (z.B. Zeit, Temperatur, Konzentration) solange modifiziert, bis die bestmögliche Konstellation gefunden ist.
Angestrebt wird die Erstellung von Rezepten zur Banden herstellung, die reproduzierbare Ergebnisse garantieren

3. E I G E N E V E R S U C H E

Die für die Routinediagnostik notwendigen und gängigsten banding-Techniken sollten auf die "Pipettenmethode" zugeschnitten werden. Bei der Auswahl der geeigneten Methoden berücksichtigte man drei Gesichtspunkte:

1. Es sollte das jeweils einfachste in der Routinediagnostik bewährte Konzept übernommen werden. Man testete vorab, ob durch Modifikation einzelner Parameter eine Bänderung überhaupt erreicht werden konnte. Fiel das Ergebnis positiv aus, konnten die Hauptuntersuchungen beginnen.
2. Es galt möglichst schnell wirkende Methoden zu bevorzugen. Die beträchtliche Zeitersparnis bei Aufarbeitung mit der "Pipettenmethode" sollte nicht durch unnötig lange Färbeverfahren verspielt werden.
   In diesem Zusammenhang wurde der Alterungsprozeß der aufgearbeiteten Chromosomen, sowie sein Einfluß auf verschiedene Parameter der jeweiligen banding-Technik untersucht.
3. Das Ziel ist eine möglichst zuverlässige und exakte Diagnostik. Daher wird auf die Qualität der erzielten Bänderung großen Wert gelegt. Jede gebänderte Metaphase wurde nach einem bestimmten Schema in einem Protokoll festgehalten (s.Abb. 1) Je nach Qualität der Metaphase wurde sie photographiert und in eine Photodokumentation übernommen.

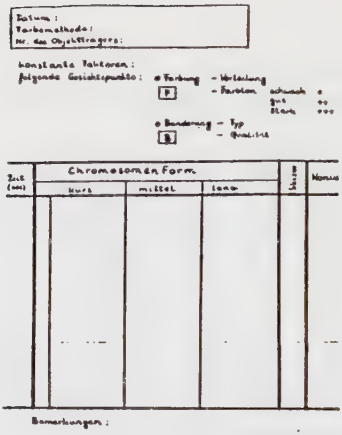


Abb. 1: Protokollblatt zur Beurteilung der Chromosomen sowie der banding-Qualität

4. M A T E R I A L und M E T H O D E

4.1. Präparateherstellung nach der "Pipettenmethode"

Die im Labor angelegten Kulturen foetaler Fruchtwasserzellen dienten als Ausgangsmaterial. Sie wurden nach folgendem Verfahren angesetzt:
Die Züchtung erfolgte in Petri-Schalen mit 5 ml Medium (Zusammensetzung: Ham'sF 1o mit 2o% foetalem Kälberserum, Fa. Seromed, 1% Penicillin-Streptomycin) bei 37 C in Brutschränken (ca. 4 Vol% CO_2 und 85-95% relative Luftfeuchtigkeit).
Bei der Aufarbeitung wurde weder das Alter der Kulturen (4-2o Tage) noch die verschiedenen Klontypen berücksichtigt (nach HOEHN, 1974, finden sich 66,5% AF-Klone, 24,7% E-Klone und 8.8% F-Klone).
Die Auswahl der Mitosen aus dem Klon erfolgte zufällig.

Ablauf der Aufarbeitung:
Sobald die ersten Mitosen erscheinen, kann begonnen werden. In weniger dringenden Fällen empfiehlt es sich

jedoch noch einen Tag zu warten und einen Mediumswechsel zur Synchronisation des Klonwachstums und der Mitoserate vorzunehmen.
Man läßt für zwei Stunden Colcemid-Lösung (o,3 ug/ml, Fa. Seromed, 37 C) auf die Kultur einwirken. Das bewirkt eine Arretierung der Zellteilung im Stadium der Metaphase.
Anschließend wird unter Sichtkontrolle (Invertoskop, Fa. Leitz, Vergrößerung 63-fach) und mit Hilfe eines Mikromanipulators (Prior, England) gearbeitet.
Mit einer Mikropipette (ausgezogene Pasteur Pipette, silikonisiert, Innendurchmesser der Spitze 2o-6o um) werden eine oder mehrere Mitosen über einen Verbindungsschlauch durch Sog aspiriert. Dann werden sie in eine silikonisierte Petri-Schale dem hypotonen Schock ausgesetzt (o,o75 molare KCL- Lösung, 37 C). Nach ca. 12-15 Minuten saugt man die Mitose(n) mit möglichst wenig hypotoner Lösung wieder in die Pipette auf.
Die Mitosen fixiert man hiernach durch schnelles und sparsames Aspirieren von Fixativ (Methanol-Eisessig Gemisch, 3+1, bei 4 C im Kühlschrank aufbewahrt).
Sofort danach werden die Mitosen auf einen Objektträger (entfettet, gründlich gewässert und bei 4 C gekühlt) aufgetropft, gefärbt, eingedeckelt und mikroskopiert.
Spätestens 5 Stunden nach Colcemidgabe wird jede Kultur einem zweimaligen Mediumwechsel unterzogen.

Photographiert wird mit:
- Film Agfa Ortho Professional 25
- Din Zahl 15

Die "Pipettenmethode" erfordert folgende Ausrüstung:

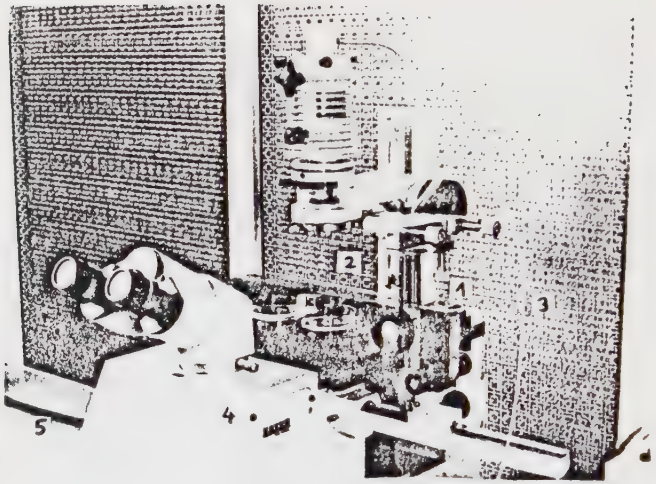


Abb. 2: Apparate, die benötigt werden:
1. Mikromanipulator
2. Mikropipette
3. Verbindungsschlauch zum Ansaugen der Mitosen
4. Invertoskop
5. Arbeitstisch

4.2. Bänderungstechnik nach Aufarbeitung mit der "Pipettenmethode"

4.2.1. G-banding

Zugrundegelegt wurde das im hiesigen Labor routinemäßig auf die "Trypsinierungstechnik" angepaßte Giemsa-banding nach SEABRIGHT (1971) mittels Trypsin.

Für die Untersuchung wurden insgesamt 437 Metaphasen gefärbt, die man wie folgt aufgeteilt hatte:

1. Frische Präparate

Anzahl der Metaphasen: 139

Vorbehandlung: 52 Metaphasen (3mal durch eine Flamme
52 Metaphasen (3o Sekunden bei 25o C)
35 Metaphasen (keine Vorbehandlung).

2. 1 Tag alte Präparate
   Anzahl der Metaphasen: 14o
   Vorbehandlung: 24 Stunden bei 7o C

3. 2 Tage alte Präparate
   Anzahl der Metaphasen: 158
   Vorbehandlung: 48 Stunden bei 7o C

Das G-banding fand mit frisch angesetzten Lösungen statt, und zwar in folgenden Schritten:

1. Inkubation bei 37 C in Trypsin-Lösung (Difco Bacto Trypsin, o,5 ml auf 7o ml physiologischer NaCl-Lösung): 1o-3o Sekunden lang in 1 bzw. 5 Sekundenabständen für die frischen Präparate.
   5-35 Sekunden lang für die 1 Tag alten und
   5-55 Sekunden lang für die 2 Tage alten Präparate.

2. Unterbrechung der Trypsinwirkung durch 3 mal kurzes Spülen in physiologischer NaCl-Lösung.

3. Färbung für 2-3 Minuten in Giemsa-Lösung (Fa.Merck, 3,5 ml in 3o ml 1/15 M KH_2PO_4-Lösung mit 3o ml 1/15 M Na_2HPO_4-Lösung, i.e. Sörenson Puffer, pH 6,7).

4. Spülen in aqua dest.

5. Mit einem Föhn trocknen und sofort mit Eukitt eindeckeln.

4.2.2. C-banding

Als Grundlage diente das in diagnostischen Problemfällen eingesetzte Verfahren nach SUMNER (1975).
Zur Standardisierung der C-Bandentechnik wurden 2o2 Metaphasen wie folgt aufgeteilt und vorbehandelt:

1. 45 Metaphasen, 3o Sekunden bei 25o C,
2. 8o Metaphasen, 24 Stunden bei 7o C,
3. 77 Metaphasen, 48 Stunden bei 7o C.

Alle Lösungen wurden frisch angesetzt.
Die $Ba(OH)_2$-Lsg. und die 1o-fach SSC-Lsg. wurden zu Beginn der Versuchszeit angesetzt und über einen Zeitraum von ca. 3 Monaten für die Durchführung des C-banding verwendet:

- $Ba(OH)_2$-Lsg. (5 g $Ba(OH)_2$ auf 1oo ml aqua dest., gut gesättigt),
- 1o-fach SSC-Lsg. (gleiche Volumina von Stammlsg. A: 87,675 g NaCl ad 1ooo ml aqua dest., und von Stammlsg. B: 44,115 g $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2\ H_2O$ (Natrium-Citrat)ad 1ooo ml aqua dest., mit 1 n NaOH auf pH 7,o einstellen).

Der Ablauf stellte sich schrittweise wie folgt dar:

1. Hydrolyse für 1 Std. bei Raumtemperatur in o,2 n HCL (2o ml 1 n HCL auf 8o ml aqua dest.), gründliches Spülen in aqua dest.,
2. Denaturierung in 5% $Ba(OH)_2$-Lsg. (1o und 15 sec lang für die frischen Präparate (Gruppe 1), 15, 3o, 6o und 9o sec lang für die 1 Tag alten sowie 15, 3o und 6o sec lang für die 2 Tage alten Präparate (Gruppe 2 und 3),
3. Renaturierung durch 1 Std. in 2 SSC-Lösg. bei 6o C (2o ml 1o SSC-Lsg. auf 8o ml aqua dest.), danach kurze Spülung in aqua dest. und Lufttrocknung,
4. 1/2 - 1 Std. Färbung in 2 Vol% Giemsa (2 ml Giemsa-Merck 92o4, auf 1oo ml aqua dest.),
5. Gründliche Spülung in aqua dest., Lufttrocknung, Eindeckeln mit Eukitt.

4.2.3. CT / T-banding

Die CT/T-Bandentechnik von SCHERES (1975) stellt eine Modifikation der oben aufgeführten C-banding Methode dar. Bei ihrer Durchführung kamen 81o Metaphasen zum Einsatz, die folgendermaßen vorbehandelt wurden:

1. 161 Metaphasen, 3o Sekunden bei 25o C
2. 319 Metaphasen, 24 Stunden bei 7o C,
3. 33o Metaphasen, 48 Stunden bei 7o C.

Folgende Lösungen wurden jeweils frisch angesetzt:

1. Eine 5%ige gesättigte und filtrierte $Ba(OH)_2$-Lösg., pH 13,
2. die sogenannte Stain-All (S.A.)-Lsg. (o,o5% in 1+1 aqua dest. und Formamid gelöst, pH 8,2).

Das Bänderungsverfahren erfolgte in zwei Schritten:

1. Denaturierung durch Inkubation in $Ba(OH)_2$-Lsg.:
   - 1o, 15, 3o und 6o sec lang für insgesamt 3o Metaphasen aus der 3. Gruppe (mit einem Alterungsprozeß von 2 Tagen) bei einer Wasserbadtemperatur von 6o C,
   - 4, 7, 1o, 15 und 2o sec lang für insgesamt 35 Metaphasen aus der 3. Gruppe bei einer Wasserbadtemperatur von 45 C,
   - 5-45 sec lang (in 5 Sekundenabständen) für insgesamt 161 Metaphasen aus der 1. Gruppe (mit einem kurzen Alterungsprozeß von 3o sec, s.o.) sowie insgesamt 265 Metaphasen aus der 3. Gruppe, zusätzlich noch 5o, 75 und 9o sec lang für insgesamt 319 Metaphasen aus Gruppe 2 (mit einem Alterungsprozeß von 1 Tag) - dies alles bei einer Wasserbadtemperatur von 4o C.
     Danach gründliche Spülung in aqua dest.

2. Färbung:
   1o min in S.A. - Lsg. 3 mal eintauchen in aqua dest. mit einem Föhn trocknen und mit Eukitt eindeckeln.

4.2.4. NOR-Darstellung

Bei Präparaten, die nach der "Trypsinierungstechnik" hergestellt worden waren, war eine NOR-Darstellung mit Hilfe der Silbermethode mehrfach gelungen. So entschied man sich für diese von BLOOM und GOODPASTURE 1976 beschriebene Methode.
281 Metaphasen wurden in 4 Gruppen aufgeteilt und wie folgt vorbehandelt:

1. 49 Metaphasen, 5o sec bei 25o C,
2. 48 Metaphasen, 24 Std. bei Zimmertemperatur aufbewahrt,
3. 88 Metaphasen, 48 Std. bei Zimmertemperatur aufbewahrt,
4. 96 Metaphasen, 72 Std. bei Zimmertemperatur aufbewahrt.

Für die einzelnen Schritte ergab sich folgender Ablauf:

1. Kurz vor dem Färben setzte man eine 5o w/v%ige $AgNO_3$-Lsg. an (z.B. 1 g auf 1 ml aqua dest., pH 4,5 - 5, hierzu aqua dest. vorher ca. 1 Std. bei 37 C im CO_2-Brutschrank inkubieren).
2. Mittels einer Spritze gab man über einen Millipore-renfilter (o,2 n) 2-4 Tropfen der $AgNO_3$-Lsg. auf die waagerecht gelegten Objektträger.
3. Die mit Deckglas abgedeckten Objektträger wurden horizontal in eine sogenannte feuchte Kammer gelegt, (man nahm eine Glasscheibe mit Deckel, bedeckte den Boden mit feuchter Watte und legte Glasstäbe auf). Die Inkubation bei 37 C dauerte 48 bzw. 72 Std. für die Metaphasen aus Gruppe 1 und 2,

24, 48, 54, 6o bzw. 72 Std. für die Metaphasen aus Gruppe 3 und 4.

4. Anschließend hielt man die Objektträger 2 min unter fließendem Wasser und spülte kurz in aqua dest. nach.
5. Nach 12-15 sec Gegenfärbung in Giemsa (2 ml Giemsa Merck 92o4, auf 1oo ml aqua dest.) wurden die Objektträger mit dem Föhn getrocknet, mit Eukitt eingedekkelt und mikroskopiert.

4.2.5. Reverse-banding

Über R-Bandentechniken liegen zahlreiche Veröffentlichungen vor. Zumeist sind sie an postnatal gewonnenen Lymphozyten entwickelt worden. Einige geeignete Methoden wurden an Präparaten getestet, die nach der "Trypsinierungstechnik" hergestellt worden waren.
Die Methoden mit Acridin-Orange und mit Chromomycin/ Methylgrün erschienen vielversprechend, weil sich auf Anhieb Reverse-Banden darstellen ließen.

4.2.5.1. Acridin - Orange Färbetechnik

In der Literatur finden sich Hinweise (DUTRILLAUX, 1978, CAMARGO und CERVENTA, 198o, PAI und THOMAS, 198o, I.YUNIS, 1981, SCHOLL-MAYER, 1981), daß die Anwendung der Synchronisationstechnik (MTX/BrdU) nicht nur die Mitosenrate erhöht, sondern auch die R-Bandendarstellung fördert.

So wurde im Hinblick auf die A.O. Färbetechnik untersucht, ob mit Hilfe einer speziellen Zellsynchronisationstechnik nach CAMARGO und CERVENTA (198o) eine Erhöhung der Mitoserate in der Amnionzellkultur zu erzielen war.

4.2.5.1.1. Methotrexat und BrdU

Untersucht wurde die günstigste Einwirkzeit von 5-Bromodeoxyuridin (BrdU) auf den Zellzyklus nach Einfluß von Methotrexat:
Es standen 4 Petri-Schalen mit ca. 1o Tage alten Kulturen zur Verfügung. Nach einer Einwirkzeit von 17 Stunden

Methotrexat (Lederle, 4,55 ug/ml, i.e. $1o^{-7}$ M MTX, frisch angesetzt) wurde das Medium dreimal gewechselt. Anschließend wurde BrdU (Hoechst, 9 ug/ml, frisch angesetzt) hinzugefügt.
Im Invertoskop wurde nach 5 Stunden das Zellteilungsstadium in stündlichen Abständen überprüft (bis zur 15. Stunde in jeweils 2 Klonen pro Petri-Schale).
Hierbei wurde die Anzahl der Mitosen notiert.
Als Kontrolle diente eine 5. Kultur, die am Vortage mit 5 ml Medium frisch gefüttert worden war.

4.2.5.1.2. Acridin - Orange
Das im folgenden beschriebene Verfahren basiert auf eine im zytogenetischen Institut der AARHUS Universität, Dänemark (198o) eingesetzte A.O.-Technik zur Darstellung von Reverse-Banden.
341 Metaphasen wurden wie folgt vorbehandelt:

1. 75 Metaphasen, 3o sec, bei 25o C,
2. 8o Metaphasen, 24 Std. bei Zimmertemperatur aufbewahrt
3. 186 Metaphasen, 24 Std. bei Zimmertemperatur aufbewahrt.

Um vor dem Pipettieren die Zellsynchronisation zu verstärken, wurde wie folgt verfahren:

1. In einer ersten Versuchsreihe wurde eine R-Bandeninduktion sowie eine Zellsynchronisation ohne MTX versucht.
   Jeweils einer Kultur (6 ml) setzte man in den letzten 24, 18, 12 Std. und danach stündlich bis 5 Std. vor dem geplanten Aufarbeitungstermin je o,1 ml BrdU zu.
   Insgesamt wurden 1o6 Metaphasen aufgearbeitet und 48 Std. bei Zimmertemperatur aufbewahrt (Gruppe 3).
   Der Färbevorgang wird weiter unten beschrieben.

2. In einer 2. Versuchsreihe ging man von den im vorigen Kapitel beschriebenen Untersuchungen zur Zellsynchronisation aus.
   Bei Erscheinen der ersten Mitosen fügte man den Kulturen MTX hinzu (Lederle, 4,55 ug/ml Medium, frisch angesetzt). Nach 17 Std. und dreimaligem Mediumwechsel setzte man jeweils einer Kultur stündlich (von der 12. bis zur 9. Std. vor dem geplanten Pipettieren) o,1 ml BrdU zu (Hoechst, 9 ug/ml, frisch angesetzt).
   Nach der Aufarbeitung wurden 75 Metaphasen mit 3o sec bei 25o C vorbehandelt und jeweils 8o Metaphasen 24 bzw. 48 Std. bei Zimmertemperatur aufbewahrt.

Der Ablauf der A.O.-Technik ergab sich schrittweise wie folgt:

1. Den Objektträger kurz hintereinander in 9o%, 7o% und 5o%igen Alkohol (3 Kuvetten) tauchen. In aqua dest. spülen und kurz an der Luft trocknen lassen.
2. Das Präparate für 1-2 Stunden in einen Behälter mit A.O.-Gebrauchslsg. legen (o,99 mg/1oo ml Sörensonpuffer, pH 6,7, frisch angesetzt, s. 4.2.1.). Die A.O.-Gebrauchslsg. wird konstant mit einem Magnetrührer (2oo Umdrehungen/Minute) bewegt. (i.e. sogenannte Gleichgewichtsfärbung).
3. Den Objektträger mit der Farblösung einlagern, das Deckglas evtl. mit Nagellack versiegeln. Sofort im Dunkeln mikroskopieren.

   Photographiert wurde im Fluoreszenzmikroskop mit dem Film Agfa Ortho Professional 25. Die DIN-Zahl betrug 24-27.
   Es wurden als Filter Kp 5oo, 51o dichroistischer Spiegel und 52o Sperrfilter eingesetzt sowie die Beleuchtungsquelle HBO 1oo.

4.2.5.2. Färbung mit Chromomycin und Gegenfärbung mit Methylgrün

Mit Präparaten, die nach der "Trypsinierungstechnik" hergestellt worden waren, funktionierte diese Technik (nach einer Anleitung von S.A. LATT, 1981) in einem Vorversuch gut.
Anhand von 373 Metaphasen übertrug man die gewonnenen Erfahrungen auf die "Pipettenmethode". Man bildete 3 Gruppen, die jeweils wie folgt vorbehandelt wurden:

1. 1o4 Metaphasen, 3o sec bei 25o C,
2. 1o1 Metaphasen, 24 Std. bei Zimmertemperatur aufbewahrt,
3. 168 Metaphasen, 48 Std. bei Zimmertemperatur aufbewahrt.

Folgende Substanzen wurden frisch angesetzt:
- Chromomycin A3-Lsg. (z.B. 1 mg Chromomycin A3, Sigma auf 2 ml Sörensonpuffer pH 6,7, ca. 1 Std. unter Bewegung lösen).
- Sörensonpuffer, pH 6,7 (1/15 M Na_2HPO_4 und 1/15 M KH_2PO_4, 1+1, o,1o2 g $MgCl_2$/Liter Puffer).
  Nach einer Versuchsreihe mit 35 Metaphasen aus der Gruppe 3 wurde das $MgCl_2$ aus dem Rezept gestrichen.
- Methylgrün - Gebrauchslsg. (2o mg Methylgrün, Sigma, in 3o ml Puffer, pH 4,2 lösen (o,o1 M NaAc und o,o1 M NaCl, 1+1) und 3o ml Hepes-Puffer, pH 7, hinzufügen (o,1 M Hepes, Gibco, und o,1 M NaCl 1+1, pH mit 1 n HCL einstellen)).
  Bei 32 Metaphasen aus der Gruppe 3 wurde eine Konzentration von 1o mg Methylgrün (statt 2o mg) genommen.

Der Ablauf stellte sich schrittweise wie folgt dar:

1. Färbung durch ca. 4 Tropfen Chromomycin A3-Lsg. auf

jedes Präparat (für 1-3 Std.), mit einem Deckglas bedecken und in eine dunkle Schale legen.

2. Nach kurzer Spülung in Sörensonpuffer, pH 6,7 (jeweils 1 min in je 2 Küvetten), 4 min Gegenfärbung in Methylgrün-Gebrauchslsg.
3. Danach die Präparate 2 mal in Glycerin (Merck) tauchen, eindeckeln und sofort in einem abgedunkelten Raum mikroskopieren.

4.2.6. Q - banding

Die Q-Banden-Darstellung erfolgte an frischen Präparaten (32 Metaphasen mit einer Vorbehandlung von 3o sec bei 25o C).
Man ging schrittweise wie folgt vor:

1. 5 min Färbung in Quinacrine-Gebrauchslösg. (5 mg QM, Sigma, in 1o5 ml aqua dest. bei 4 C, lichtempfindlich).
2. Kurzes Spülen in Sörensonphosphatpuffer (pH 6,7, s. 4.2.1.).
3. Vorsichtiges Trocknen zwischen Papiertüchern und anschließende Einlagerung in einer Mischung von Glycerol und Sörensonphosphatpuffer (pH 6,7, 1+1). Sofort in einem abgedunkelten Raum mikroskopieren.

Im Anschluß an das Q-banding wurde bei 2 Präparaten (5 Metaphasen) ein Giemsa-banding versucht. Hierzu wurden die Präparate nacheinander in aqua dest. und Fixationslösg. (Methanol-Eisessig Gemisch, 3+1, 4 C) gespült, getrocknet und einmal durch die Flammes eines Bunsenbrenners geführt.
Danach wurden die Präparate einem G-banding unterzogen (s. 4.2.1.).

5. E R G E B N I S S E

5.1. Präparateherstellung nach der "Pipettenmethode"

Die Ausbeute an auswertbaren Metaphasen hing von mehreren Faktoren ab:

1. Es empfahl sich, 1 1/2 - 2 1/2 Std. nach Colcemidzugabe mit dem Pipettieren zu beginnen. Vorher hatte die Arretierung im Metaphasenstadium noch nicht genug Zellen erfaßt, nachher hatte die Chromosomenkondensation zu stark zugenommen.
2. Die Entnahme der Mitosen mußte streng gezielt erfolgen, um qualitativ ausreichende Metaphasen zu erhalten: Ausschliesslich runde, scharf begrenzte und leicht vom Boden ablösbare Zellen waren hierzu geeignet. Trotzdem befanden sich 3 von 5o aufgesaugten Mitosen in einem früheren Teilungsstadium als der Metaphase.
3. Es erwies sich als das günstigste, die Zellen für 13 Minuten in der hypotonen Lösung zu belassen. Dennoch zeigten 3 von 5o Zellen im hypotonen Schock keine Quellung. Bei 6 von 5o Zellen war ein Verlust der Membranstabilität eingetreten.

5.2. Bänderungstechniken nach Aufarbeitung mit der "Pipettenmethode"

5.2.1. G-banding

Im Vergleich zur Hitzebehandlung durch eine Flamme (Bunsenbrenner) zeigte die Vorbehandlung im Brutschrank (3o sec bei 25o C) keine Unterschiede bezüglich des späteren Verhaltens beim Färben. Dagegen erwiesen sich die un-

behandelten Metaphasen als weit empfindlicher gegenüber der Trypsin-Denaturierung. Dies wurde bei der zur Bänderung erforderlichen Einwirkzeit deutlich, die mit derjenigen der vorbehandelten Metaphasen übereinstimmte. In Abbildung 3 sind 2 frische Metaphasen gegenübergestellt (unbehandelt und vorbehandelt).
Die optimale Denaturierungsdauer betrug 17-2o sec (s. Tabelle 1 und Abb. 4).
Bei einer kürzeren Trypsin-Einwirkzeit waren die Metaphasen nicht oder nur schwach und unvollständig gebändert. Bei einem zu langen Trypsinbad waren die Chromosomen überbändert, i.e. aufgequollenund teilweise sogar destruiert.

Gleiches gald für die 1 und 2 Tage alten Präparate (Gruppe 2 und 3). Dort war aber die zum Ergebnis führende Zeitspanne größer:
Bei den 1 Tag alten Präparaten wurde ein G-banding zwischen 25 und 45 sec erreicht, bei den 2 Tage alten Präparaten zwischen 25 und 5o sec.
Den Einfluß des Alterungsprozesses auf die erforderliche Trypsineinwirkdauer verdeutlichen Tabelle 1 und Abbildung 4, in denen die Versuchsergebnisse aufgelistet sind.

Die Qualität der Bänderung ergibt sich aus der Anzahl und Trennschärfe der Banden. Sie wurde auch durch folgende Parameter beeinflußt:
Wichtig war eine gute Fixation der Chromosomen. Sie war nur durch schnelles Aufsaugen der Fixationslösung in die Pipette (s. hierzu 4.1.) zu erreichen. Auch die Größe und Form der Chromosomen spielte eine Rolle. Bei kurzen und gestauchten Chromosomen konnten weniger Banden dargestellt werden als bei lang gestreckten.

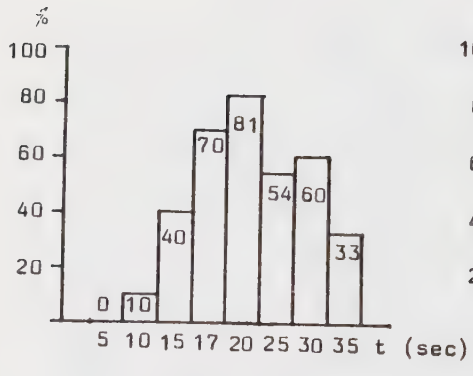
Abb. 3: G-banding
(frisches Präparat, keine Vorbehandlung)

G-banding
(frisches Präparat, Vorbehandlung im Brutschrank: 3o sec bei 25o C)

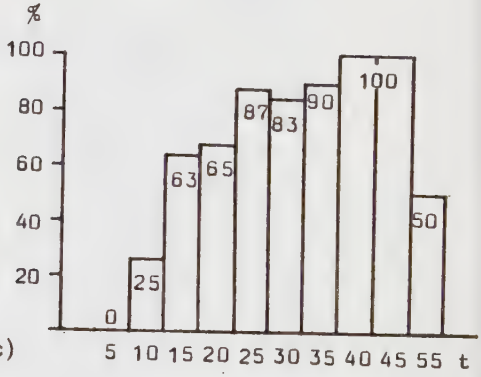
Zeit (sec)	frisch	1 Tag	2 Tage
5	o/1o (o%)	o/1o (o%)	o/9 (o%)
1o	1/1o (1o%)	3/12 (25%)	2/1o (2o%)
15	8/2o (4o%)	1o/16 (63%)	3/18 (16%)
17	25/36 (7o%)	-.-	-.-
2o	21/26 (81%)	21/32 (65%)	1o/17 (6o%)
25	7/13 (54%)	13/15 (87%)	1o/12 (83%)
3o	8/14 (6o%)	1o/12 (83%)	9/12 (7o%)
35	3/1o (33%)	1o/11 (9o%)	11/16 (67%)
4o	-.-	1o/1o (1oo%)	16/2o (8o%)
45	-.-	12/12 (1oo%)	-.-
5o	-.-	-.-	16/2o (8o%)
55	-.-	5/1o (5o%)	7/1o (7o%)
6o	-.-	-.-	7/14 (5o%)
Summe	139	14o	158

Tabelle 1: Anteil gebänderter Metaphase an der eingesetzten Gesamtzahl in Abhängigkeit von der Trypsineinwirkzeit und dem Alterungsprozeß der Chromosomen (in Klammern, die Bänderungsrate in Prozent).

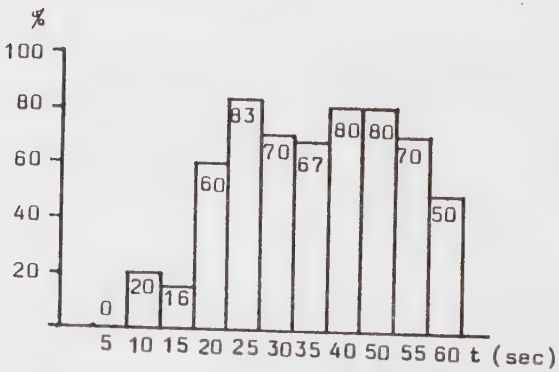
Abb. 4: Prozentualer Anteil an gebänderten Metaphasen in Abhängigkeit von der Trypsineinwirkungszeit (G-banding)



frische Präparate



1 Tag alte Präparate



2 Tage alte Präparate

Empfohlenes Rezept zum G-banding

1. Vorbehandlung:
   - frische Präparate (3o sec bei 25o°C)
   - 1 Tag alte Präparate (24 Std. bei 7o°C)
   - 2 Tage alte Präparate (48 Std. bei 7o°C)

2. Denaturierung:
   17-2o sec (frische Präp.)
   35-45 sec (1 Tag alte Präp.)
   35-5o sec (2 Tage alte Präp.) in Trypsin-Lsg.
   (Difco Bacto Trypsin, o,5 ml auf 7o ml physiolog. NaCl-Lsg., auf 37°C im Wasserbad erwärmt)

3. 3 mal spülen in physiologischer NaCl-Lsg.

4. Färbung:
   2-3 min in Giemsa-Lsg. (Fa. Merck, 3,5 ml in 6o ml Sörenson Puffer, i.e. 3o ml 1/15 M KH_2PO_4-Lsg. + 3o ml 1/15 M Na_2HPO_4-Lsg. pH 6,7)

5. Spülen in aqua dest.

6. Trocknen (Föhn) und mit Eukitt eindeckeln.

5.2.2. C - banding

Tabelle 2 gibt die Versuchsergebnisse wieder. Wie aus ihr und Abbildung 6 ersichtlich ist, erwies sich eine Denaturierungsdauer von 15 sec als optimal für alle Metaphasen ungeachtet des Alterungsprozesses (s. auch Abb. 5).
Bei dieser Zeit waren nur Metaphasen aus der 2. Gruppe (24 Std. bei 7o°C) nicht alle gebändert (2o von 25). Kürzer behandelte Metaphasen hatten blaße und unscharfe Chromosomen. Längeres Einwirken von $Ba(OH)_2$ wirkte sich schädlich auf die Chromosomenstruktur aus (Aufquellung, Vakuolen, Auflösung).
Langsamer fixierte Präparate zeigten sich sehr viel widerstandsfähiger, so daß bei ihnen auch mit längeren Zeiten ein C-banding darstellbar war. Darauf beruhen die positiven Ergebnisse bei 3o und 6o sec (s. Abb. 6). Bei 15 sec spielte die Fixationsqualität keine Rolle. Die im Gegensatz zum scharf markierten Zentromer eher blassen Chromosomenarme konnte man durch längeres Färben in Giemsa (mindestens 1 Std.) verstärken, da sonst die Chromosomenarme kaum zu erkennen waren.

Tabelle 2: Anteil C-gebänderter Metaphasen an der eingesetzten Gesamtzahl in Abhängigkeit von der Denaturierungsdauer und dem Alterungsprozeß der Chromosomen (in Klammern, die Bänderungsrate in %).

Zeit (sec)	frisch	1 Tag	2 Tage
1o	16/2o (8o%)	-.-	-.-
15	25/25 (1oo%)	2o/25 (8o%)	25/25 (1oo%)
3o	-.-	14/2o (7o%)	18/3o (6o%)
6o	-.-	12/2o (6o%)	13/22 (59%)
9o	-.-	o/15 (0%)	-.-
Summe	45	8o	77

Abb. 5: C-banding
(frisches Präparat, 15 sec Denaturierungsdauer in $Ba(OH)_2$-Lsg.)

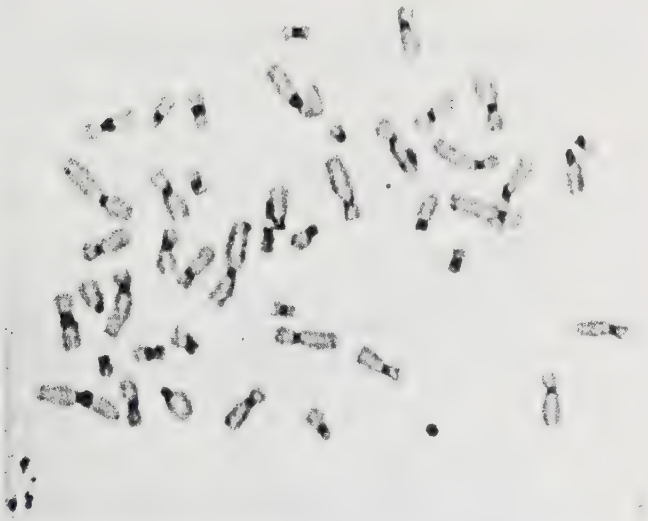
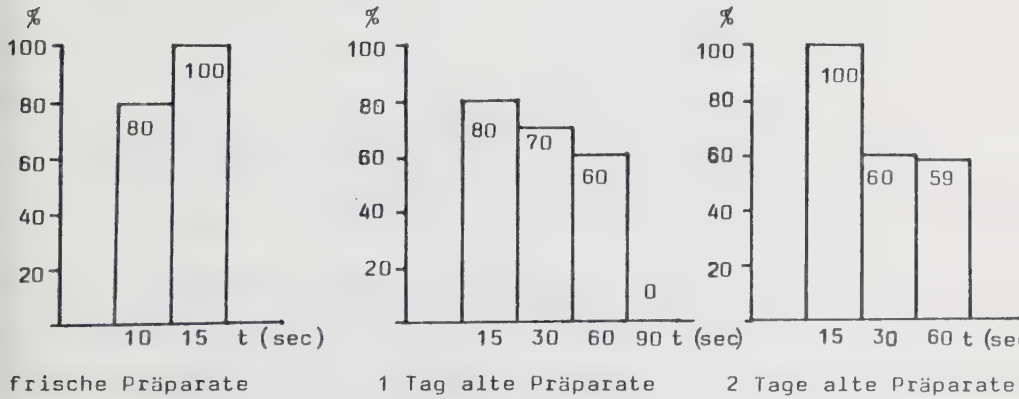


Abb. 6: Prozentualer Anteil an C-gebänderten Metaphasen in Abhängigkeit von der Denaturierungszeit in $Ba(OH)_2$-Lösung.



frische Präparate 1 Tag alte Präparate 2 Tage alte Präparate

Empfohlenes Rezept zum C-banding:

1. Vorbehandlung: (wie beim G-banding)

2. Hydrolyse:
   1 Std. in o,2 n HCL (2o ml 1 n HCL auf 8o ml aqua des
   bei Raumtemperatur, mit aqua dest. gut spülen

3. Denaturierung:
   Die Präparate (frisch, 1 und 2 Tage alt) 15 sec bei 5o°C in 5% $Ba(OH)_2$-Lsg. geben (5 g $Ba(OH)_2$ auf 1oo ml aqua dest., gut gesättigte Lsg., vor Gebrauch filtrie

4. Renaturierung:
   1 Std. in 2 SSC-Lsg. bei 6o°C (2o ml 1o SSC-Lsg. auf 8o ml aqua dest.)

5. Färbung:
   1/2 - 1 Std. in 2 Vol% Giemsa (2 ml Giemsa (Merck 92o4) auf 1oo ml aqua dest.)
   Abspülen in aqua dest., lufttrocknen, in Eukitt eindeckeln.

Ansatz der 1o-fach SSC-Lsg.:
Stammlsg. A: 87,675 g NaCl ad 1ooo ml aqua dest.
Stammlsg. B: 44,115 g $C_6H_5Na_3O_7$ 2 H_2O (Na-Citrat)
ad 1ooo ml aqua dest.

Gleiche Volumina Stammlsg. A und B zusammengeben und mit 1 n NaOH auf pH 7,o einstellen.

5.2.3. CT / T-banding

Das ursprüngliche Ziel, entsprechend den Literaturangaben (SCHERES, 1975) ein R-banding zu erhalten, konnte nicht erreicht werden.
Bei einer Wasserbadtemperatur von 60°C (s. Abb. 4.2.3.) reagierten die nach der "Pipettenmethode" gewonnenen Chromosomen sehr empfindlich. Dies, obwohl man für den ersten Versuch die meist stabileren Chromosomen aus der 3. Gruppe (längerer Alterungsprozeß von 48 Std.) eingesetzt hatte. Sie wiesen zwar regelmäßig eine Bänderung auf, waren aber teilweise gequollen, teilweise angedaut (s.Tab. 3). Kürzere $Ba(OH)_2$-Einwirkzeiten brachten keine Modifikation.
Die Wasserbadtemperatur wurde auf 45°C erniedrigt, ohne daß sich eine Änderung ergab (s. Tabelle 4). Erst bei 40°C konnte ein relativ stabiles CT/T-banding erzielt werden (s. Abb. 7).
Abbildung 8 zeigt den prozentualen Anteil an gebänderten Metaphasen in Abhängigkeit von der Denaturierungsdauer. Die absoluten Zahlen sind aus Tabelle 5 zu entnehmen:
Statt einer optimalen Zeit ergab sich eine breite Verteilung. Im Grunde konnte, mit wechselndem Erfolg jede Einwirkdauer zwischen 15 und 60 sec gewählt werden. Bei kürzeren Zeiten nahm der Anteil an homogen, undifferenziert durchgefärbten Chromosomen zu, bei längeren Zeiten der Anteil an beschädigten Chromosomen.

Andere Parameter fielen ins Gewicht:
Der pH-Wert der Stain-All Farblösung mußte laufend kontrolliert und mindestens alle 3 Objektträger mit Natronlauge korrigiert werden. Andernfalls wurde er regelmäßig blasser.
Mit Rücksicht auf ihre Licht- und Luftempfindlichkeit

mußte die Stain-All Lösung in einem möglichst lichtundurchlässigen Behälter mit Deckel aufbewahrt werden, auch während ihres Gebrauchs. Sonst verlor sie ihre färbende Wirkung.
Die Fixationsqualität besaß eine gewisse Bedeutung. Graue, klare, also schnell fixierte Chromosomen tendierten zu blasserer Färbung und schwächerer Bänderung.

Spiegelnde, hart konturierte, kontrastreiche, also langsamer fixierte Chromosomen wiesen das gegenteilige Merkmal auf. Sie reagierten weniger empfindlich auf den Denaturierungsprozeß.
Entsprechend war die $Ba(OH)_2$-Einwirkdauer hier länger zu wählen.

Die unterschiedlichen Alterungsprozesse der Chromosomen (3o sec bei 25o C und 24 bzw. 48 Std. bei 7o C) hatten offenbar keinen Einfluß auf die Bänderungsrate bei einer jeweils gleichen $Ba(OH)_2$-Einwirkzeit.

Die fertigen Präparate mußten sofort, am besten im abgedunkelten Raum, mikroskopiert werden. Unter Lichteinfluß blaßten sie rapide, im Dunkeln langsam ab.

Insgesamt fiel ein manchmal unregelmäßiges Bändungsmuster auf: Neben regelrechten CT-gebänderten Metaphasen überwog in einigen Metaphasen das C-banding, in anderen das T-banding, dies bei sonst konstanten Bedingungen.

Abb. 7: CT/T-banding
(1 Tag altes Präparat, 45 sec Denaturierungszeit in $Ba(OH)_2$-Lsg., 40°C Wasserbadtemperatur)

Zeit (sec)	2 Tage
1o	7/8
15	8/8
3o	6/7
6o	7/7
Summe	3o

Tabelle 3

Zeit (sec)	2 Tage
4	6/7
7	7/7
1o	6/7
15	6/7
2o	7/7
Summe	35

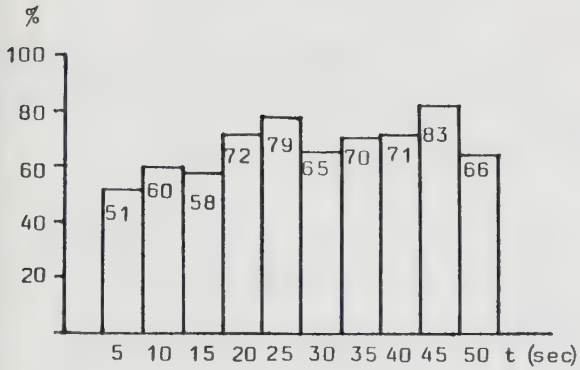
Tabelle 4

C-T-banding
Wasserbadtemperatur der $Ba(OH)_2$-Lsg. 6o C (Tab. 3) bzw. 45 C (Tab. 4).

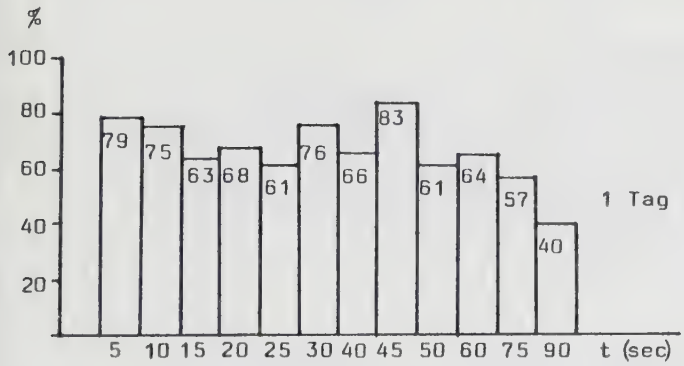
Zeit (sec)	frisch	1 Tag	2 Tage
5	14/25 (51%)	15/19 (79%)	22/38 (58%)
1o	6/1o (6o%)	42/56 (75%)	53/81 (65%)
15	7/12 (58%)	1o/12 (63%)	2o/31 (65%)
2o	13/18 (72%)	36/53 (68%)	13/19 (68%)
25	11/14 (79%)	17/28 (61%)	9/18 (5o%)
3o	15/23 (65%)	25/33 (76%)	11/14 (79%)
35	7/1o (7o%)	-.-	6/14 (43%)
4o	1o/14 (71%)	8/12 (66%)	15/18 (83%)
45	1o/12 (83%)	2o/24 (83%)	12/16 (75%)
5o	14/21 (66%)	11/18 (61%)	11/16 (69%)
6o	-.-	9/14 (64%)	-.-
75	-.-	17/3o (57%)	-.-
9o	-.-	8/2o (4o%)	-.-
Summe	161	319	265

Tabelle 5:(Wasserbadtemperatur der $Ba(OH)_2$-Lsg. 4o C)
Anteil C-T-gebänderter Metaphasen an der eingesetzten Gesa zahl in Abhängigkeit von der Denaturierungsdauer und dem Alterungsprozeß der Chromosomen (in Klammern, die Bänderungsrate in Prozent).

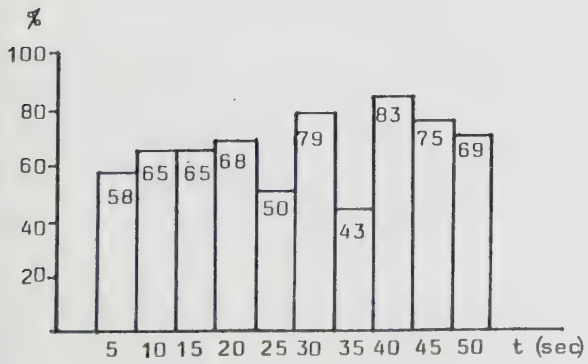
Abb. 8: Prozentualer Anteil an C-T-gebänderten Metaphasen in Abhängigkeit von der Denaturierungszeit in $Ba(OH)_2$-Lösung bei einer Wasserbadtemperatur von 40°C



frische Präparate



1 Tag alte Präparate



2 Tage alte Präparate

Empfohlenes Rezept zum C-T-banding:

1. Vorbehandlung: (wie beim Giemsa-banding)
2. Denaturierung:
   Präparate (frisch, 1 und 2 Tage alt) 25 - 45 sec in o,5% gesättigte und filtrierte $Ba(OH)_2$-Lsg. (pH 13, 4o C) geben.
   Gründliche Spülung in aqua dest.
3. Färbung:
   1o min in Stain-All Lsg. (o,o5% in 1:1 aqua dest. und Formamid, insgesamt 1oo ml, pH 8,2 mit 1 n NaOH einstellen).
   Dreimal in aqua dest. eintauchen, mit dem Föhn trocknen und mit Eukitt eindeckeln.

Zu beachten:

1. Die S.A, Lsg. ist lichtempfindlich.
2. Der pH der S.A.Lsg. muß laufend kontrolliert und korrigiert werden, da er neutraler wird.
3. Die fertigen Präparate blassen unter Lichteinwirkung ab.

5.2.4. NOR - Darstellung

Die NORs ließen sich nur an langsam fixierten Chromosomen darstellen (Merkmal: hart konturiert, kontrastreich, spiegelnd).
Unter Lichteinfluß blaßten sie schnell ab, nach einem Tag waren sie nicht mehr zu sehen. Daher mußten die Objektträger sofort mikroskopiert oder im Dunkeln aufbewahrt werden.

In Abb. 9 und Tab. 6 erkennt man eine deutliche Zunahme der NOR-Markierung ab einem Alterungsprozeß von mindestens 2 Tagen und einer $AgNO_3$-Einwirkzeit von mindestens 72 Std.,

Präparate aus den Gruppen 1 und 2 (3o sec bei 25o C und 24 Std. bei Zimmertemperatur) zeigten meist keinen Silberniederschlag in NOR-Bereichen.

Die höchste Markierungsrate wiesen die Metaphasen mit einem Alterungsprozeß von 72 Std. auf (94%).
Dabei variierte die NOR-Anzahl von Metaphase zu Metaphase (s. Abb. 1o) zwischen 4 und 8.

Im Lichtmikroskop erschienen die markierten Stellen als schwarze Pünktchen, wobei die Farbintensität unterschiedlich stark ausgeprägt war. Sie lagen distal am kurzen Arm der braungrau gefärbten akrozentrischen Chromosomen.
Eine kürzere Giemsa-Gegenfärbung als 13 sec ergab blasse Chromosomen. Bei mehr als 14 sec waren die Chromosomen intensiver durchgefärbt.

Tabelle 6: Anteil von Metaphasen mit Silberniederschlag (NOR-Darstellung) an der eingesetzten Gesamtza in Abhängigkeit von der Silbernitrateinwirkzei und dem Alterungsprozeß (in Klammern die Marki rungsrate in Prozent).

Zeit (Std.)	frisch	1 Tag	2 Tage	3 Tage
24	-.-	-.-	4/2o (2o%)	8/15 (5
48	4/2o (2o%)	4/22 (18%)	6/21 (29%)	21/3o (7
54	-.-	-.-	6/14 (43%)	14/2o (7o
72	8/29 (27,5%)	6/26(23%)	26/33 (8o%)	29/31 (94
Summe	49	48	88	96

Abb. 1o: NOR-Darstellung
(3 Tage altes Präparat, 72 Std. Silbernitrat-einwirkzeit)

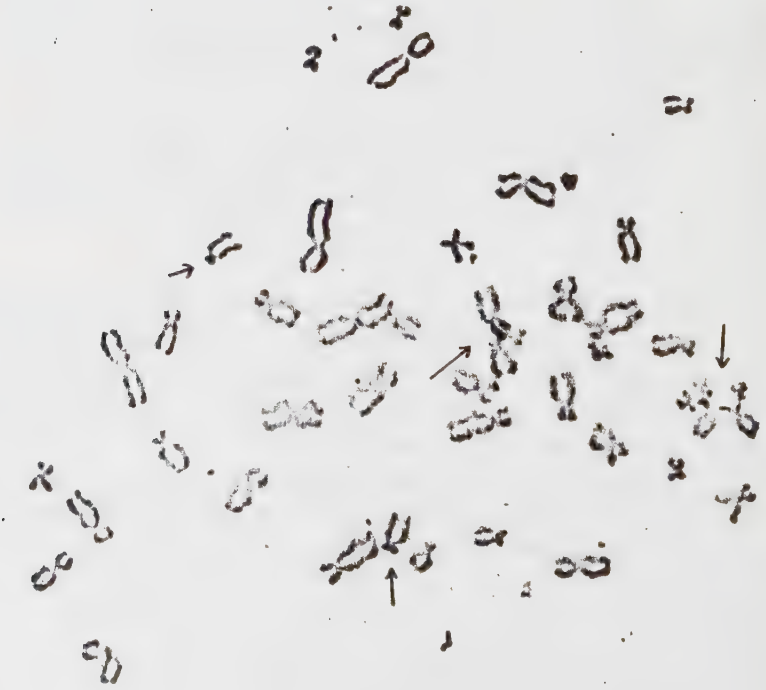
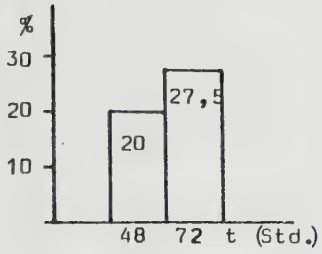
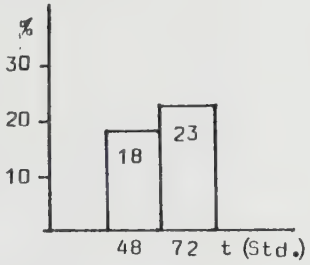


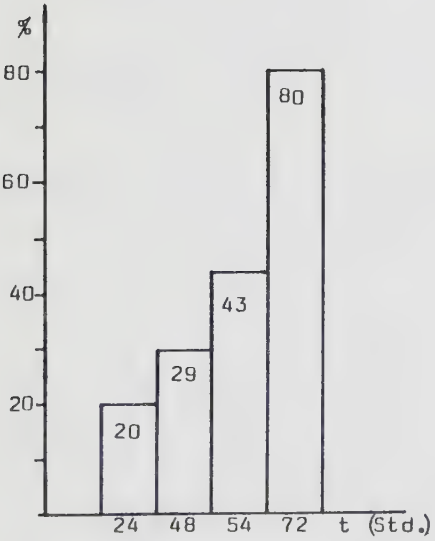
Abb. 9: Prozentualer Anteil von Metaphasen mit markierten NORs in Abhängigkeit von der Silbernitrat-Einwirkzeit



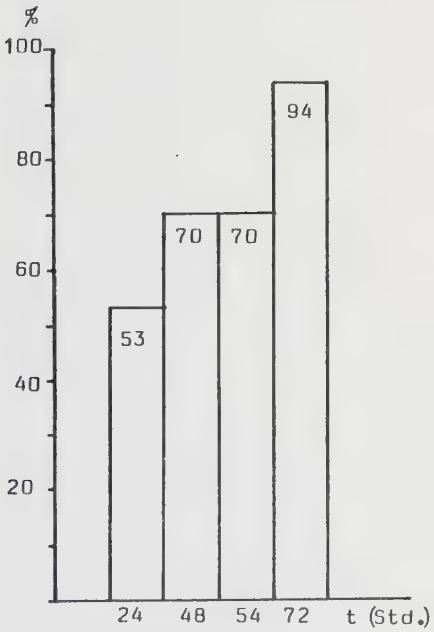
frische Präparate



1 Tag alte Präparate



2 Tage alte Präparate



3 Tage alte Präparate

Empfohlenes Rezept zur NOR-Darstellung:

0. Keine Vorbehandlung - die Präparate können bei Zimmertemperatur aufbewahrt werden.
1. 2 oder 3 Tage alte Präparate verwenden.
2. $AgNO_3$-Lsg. kurz vor dem Färben ansetzen (5o w/v%ige Lsg. , z.B. 1 g auf 2 ml aqua dest., pH 4,5 - 5 . (hierzu aqua dest. ca. 1 Std. vorher im CO_2-Brutschrank bei 37 C inkubieren).
3. Mittels einer Spritze 2-4 Tropfen aufgelöste $AgNO_3$-Lsg. über einen Milliporenfilter (o,2 n) auf die waagerecht gelegten Objektträger geben.
4. Sofort mit einem Deckglas abdecken (ohne Luftblasen).
5. Waagerecht in eine sogenannte feuchte Kammer legen und 72 Std. bei 37 C inkubieren.
6. Feuchte Kammer: z.B. eine große Glasschale mit Deckel feuchter Watte auf dem Boden und Glasstäbe darüber als Unterlage für die Objektträger.
7. Objektträger 2 Min unter fließendem (Leitungs)-wasser halten (Deckglas fällt ab) und mit aqua dest. nachspülen.
8. Gegenfärbung mit Giemsa (s. G-banding) 13-14 sec, mit dem Föhn trocknen, eindeckeln und sofort mikroskopieren, da es abblaßt.

5.2.5. Reverse-banding

5.2.5.1. Acridin-Orange Färbetechnik
Zunächst sollte überprüft werden, ob mit Methotrexat und BrdU eine Synchronisation wachsender Amnionzellen erzielt werden konnte.
Bei gutem Erfolg sollte hiernach geprüft werden, ob man mit der Kombination einer Zellsynchronisationstechnik und der A.O.Färbetechnik die Darstellung von Reverse-Banden fördern konnte.

5.2.5.1.1. Methotrexat und BrdU
Die Synchronisationstechnik mit Methotrexat und BrdU brachte positive Ergebnisse.
Die höchsten Mitosenraten wurden ungefähr 1o bis 12 Stunden nach Unterbrechung des Methotrexatblocks durch Mediumwechsel und anschließender BrdU-Anreicherung beobachtet.

Wenn man die Unterschiede in der Mitoserate zwischen nichtsynchronisierten und synchronisierten Kulturen verglich, stellte man folgendes fest(s. auch Tabelle 7):

1. In der nichtsynchronisierten Kontrollkultur ergab sich keine signifikante Änderung des Mitoseindex im beobachteten Zeitraum von 9 Stunden.
2. In den synchronisierten Kulturen fand man eine in fast allen Kulturen gleichwellig verlaufende Erhöhung der Mitoserate. Dabei entfiel die höchste Rate nicht auf einen bestimmten Zeitpunkt, sondern auf einen breiten Zeitraum von 1o bis 12 Stunden.
3. Es war keine vollständige Synchronisation erreicht worden, i.e. in den jeweiligen Kulturen befanden sich nicht alle Zellen im gleichen Teilungsstadium.

Klon 1 aus der Kultur B fiel aus dem Rahmen. 8 Stunden nach BrdU-Zugabe hatte sich die Mitosenzahl von 4, ent-

gegen dem allgemeinen Trend, um 1 Zelle verringert. 2 Stunden später war keine Mitose mehr vorhanden. Die Zellpopulation des Klons machte einen angegriffenen Eindruck:
Es fanden sich in der Mehrzahl geschrumpfte Zellen mit verdichtetem Kern. Meist hatten sie die Haftung mit dem Boden verloren.

Tabelle 7: Zahl der Mitosen in den Klonen in Abhängigkeit von der BrdU-Einwirkzeit

		Zeit nach BrdU-Inkorporation (Stunden									
		6	7	8	9	1o	11	12	13	14	15
Kultur A	Klon 1	5	5	6	7	8	8	7	8	5	5
	Klon 2	6	6	7	9	1o	1o	11	1o	8	7
Kultur B	Klon 1	4	4	3	2	-	-	-	-	-	-
	Klon 2	5	6	6	7	8	8	8	7	7	5
Kultur C	Klon 1	1	2	2	3	4	4	3	4	2	2
	Klon 2	-	1	1	3	3	5	5	4	2	3
Kultur D	Klon 1	-	-	1	1	3	3	3	2	3	4
	Klon 2	1	1	1	2	2	3	3	3	2	1
Kontroll-Kultur	Klon 1	4	3	3	4	5	5	3	4	3	5
	Klon 2	1	1	1	-	-	-	1	2	2	1

Vorgehen bei der Zellsynchronisationstechnik:

1. Am Vortage die Kultur mit 5 ml Medium füttern.
2. Methotrexat (Lederle, 4,55 ug/ml, i.e. $1o^{-7}$ M MTX, frisch angesetzt) 17 Std. einwirken lassen.
3. Dreimal das Medium wechseln, zuletzt 5 ml belassen und BrdU (Hoechst, 9 ug/ml, frisch angesetzt) hinzufügen.
4. Nach 9 Std. Colcemid-Lsg. (o,3 ug/ml, Fa. Seromed, 37 C) dazugeben.
5. Nach 2 Std. Beginn der Aufarbeitung.

5.2.5.1.2. Acridin-Orange

Die Färbung mit A.O. ergab gelb-grün oder orange-rot fluoreszierende Banden oder homogen gefärbte Chromosomen. Unter den 341 Metaphasen gab es keinen einzigen komplett everse-gebänderten Chromosomensatz. Dies galt für die Versuchsreihen mit und ohne MTX. Entsprechend sind die in Tabelle 9 angeführten Zahlen zu verstehen:
Es handelte sich zumeist um teilgebänderte Metaphasen, die den nicht gebänderten Metaphasen gegenübergestellt wurden.
Ein Vergleich beider Versuchsreihen (MTX / BrdU und BrdU alleine) zeigte folgende Unterschiede:
Bei alleiniger BrdU-Vorbehandlung war der Anteil an teilgebänderten Metaphasen größeren Schwankungen unterworfen, als bei vorheriger MTX-Zugabe (Abb. 12 und 13). Bei der MTX/BrdU-Technik blieb die Bänderungsrate im untersuchten Zeitraum (9-12 Stunden) relativ gleichmäßig. Bei der BrdU-Technik änderte sie sich fast stündlich.
Bei Einsatz von MTX war der Anteil an teilgebänderten Metaphasen insgesamt etwas höher (s. Tab. 7 und 8 im Vergleich). Unter den untersuchten Metaphasen fielen in erhöhtem Maße Endomitosen auf.

Wegen ihrer großen Lichtempfindlichkeit mußten die Präparate in einem abgedunkelten Raum untersucht werden, möglichst sofort nach der Färbung.
Im Fluoreszenzmikroskop leuchteten die grünen oder gelb-grünen Banden bzw. Chromosomen intensiver als die orange oder orange-roten. Dies ließ sich beim Photographieren anhand der Negative (schwarz-weiß) feststellen.
Im UV-Licht des Mikroskopes blaßten die Chromosomen innerhalb von 2-3 Minuten ab.
Der Alterungsprozeß besaß keinen erkennbaren Einfluß. Zwischen frischen und 2 Tage alten Präparaten waren kaum Unterschiede festzustellen (s. Abb. 11).
Die Fixationsqualität spielte insofern eine Rolle, als langsam fixierte Metaphasen eine stärkere Leuchtkraft besaßen als schnell fixierte. Dies galt unabhängig von einer möglichen Bänderung.

Abb. 11: Acridin-Orange Färbetechnik
(frisches Präparat, 17 Std. MTX und 11 Std. BrdU-Einwirkdauer)

Abb. Acridin-Orange Färbetechnik
(2 Tage altes Präparat, Vorbehandlung wie in Abb. 11)

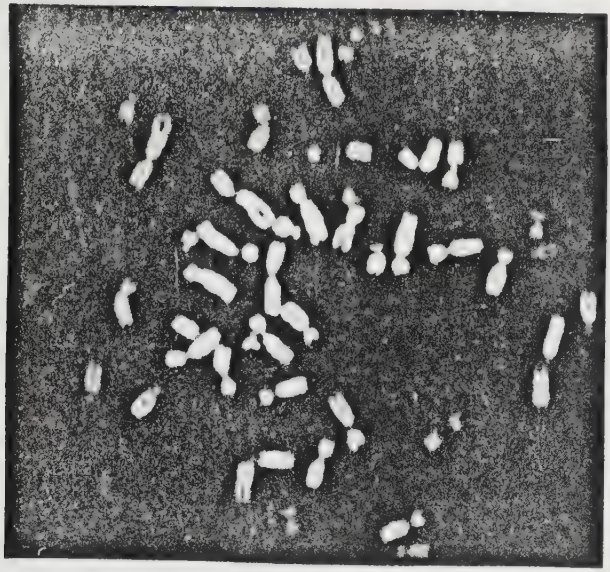


Tabelle 8: Anteil (teil-)gebänderter Metaphasen an der eingesetzten Gesamtzahl in Abhängigkeit von der BrdU-Einwirkdauer (in Klammern die Bänderungsrate in Prozent)

Zeit (Std.)	2 Tage
5	6/24 (25%)
6	1/24 (4%)
7	1/2o (5%)
8	7/21 (33%)
9	7/14 (5o%)
1o	6/26 (23%)
11	1o/24 (41%)
12	2/3o (5%)
18	8/16 (5o%)
24	8/17 (47%)
Summe	1o6

Tabelle 9: (vorherige 17-stündige Inkubation mit MTX)
Anteil (teil-)gebänderter Metaphasen an der eingesetzten Gesamtzahl in Abhängigkeit von der BrdU-Einwirkdauer und dem Alterungsprozeß (in Klammern, die Bänderungsrate in Prozent)

Zeit (Std.)	frisch	1 Tag	2 Tage
9	12/21 (57%)	1o/2o (5o%)	31/21 (62%)
1o	8/18 (44%)	8/18 (44%)	8/2o (4o%)
11	9/14 (69%)	1o/22 (45%)	11/22 (5o%)
12	12/22 (55%)	6/2o (33%)	11/17 (65%)
Summe	75	8o	8o

Abb. 12: Prozentualer Anteil von (teil-)R-gebänderten Metaphasen an der Gesamtzahl in Abhängigkeit von der BrdU-Einwirkdauer.

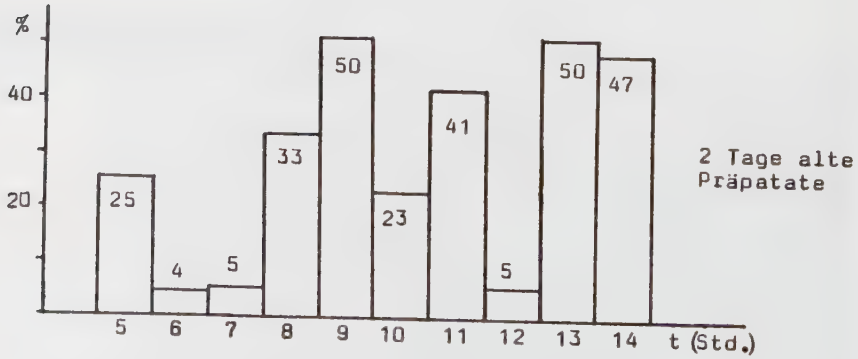
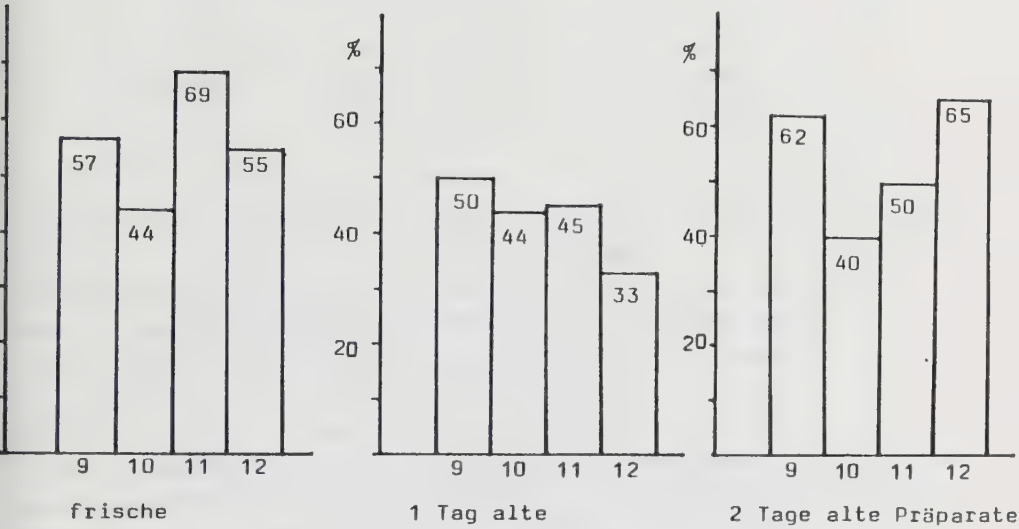


Abb. 13: Prozentualer Anteil von (teil-) R-gebänderten Metaphasen an der Gesamtzahl in Abhängigkeit von der BrdU-Einwirkdauer und nach 17 Stunden MTX



Empfohlenes Rezept bei der A.O.Färbung:

1. Vorbehandlung:
   Frische Präparate (3o sec bei 25o C), ältere Präparate (keine Vorbehandlung).
2. Teilsynchronisation: (s. die Teilsynchronisationstechnik).
3. Denaturierung:
   Aufeinanderfolgendes kurzes Eintauchen in 9o, 7o, 5o%igen Alkohol und in aqua dest (4 Kuvetten). Trocknen lassen.
4. Färbung:
   1-2 Std. in einer A.O.Auflösung (o,99 mg/1oo ml Sörensonpuffer, pH 6,7, frisch angesetzt), die

konstant mit einem Magnetrührer beweg wird (2oo Umdrehungen/min).
Den Objektträger mit der Farblösung einlagern, Deckglas evtl. mit Nagellack versiegeln.

Zu beachten:
Die große Lichtempfindlichkeit der A.O.-Gebrauchslösung.

5.2.5.2. Färbung mit Chromomycin und Gegenfärbung mit Methylgrün

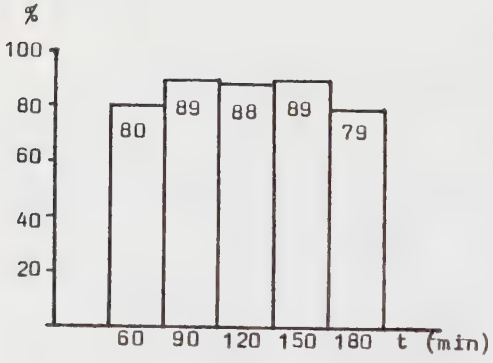
In den meisten Fällen konnte ein Reverse-Bandenmuster dargestellt werden. Es bestand kein Unterschied zwischen verschiedenen alten Präparaten. Die Teilergebnisse sind in Tabelle 1o aufgeführt.
Ebenso undifferenziert positiv war der Bänderungserfolg im gesteckten Rahmen von 6o - 18o min Chromomycineinwirkzeit: Abbildung 14 zeigt den Bänderungserfolg in Abhängigkeit vom Alterungsprozeß und von der Chromomycineinwirkzeit.
Hinsichtlich der Qualität, womit die Leuchtkraft der orange-grünlichen fluoreszierenden Banden gemeint ist, waren 6o min Chromomycin-Einwirkzeit etwas kurz:
Die gebänderten Chromosomen leuchteten zu schwach für eine photographische Aufnahme.
Die sehr lichtempfindlichen Präparate mußten sofort und im Dunkeln mikroskopiert werden.
Im Fluoreszenzmikroskop blühten die Banden unter UV-Licht nach ca. 1 - 2 min auf. Sie "verglühten" unterschiedlich schnell (nach 2-5 min) und wurden unauswertbar.
Die Fixationsqualität war unerheblich, ebenso das im Originalrezept angegebene $MgCL_2$. Es wurde zunächst probe-

weise und dann endgültig beim Ansetzen der Chromomycinlösung weggelassen (s. Tab. 1o).
Die angesetzten Lösungen waren instabil. Mit 6 Tagen alten Substanzen waren keine fluoreszierenden Banden mehr zu erzielen.
Bei einer Methylgrünkonzentration von 1o mg waren die Chromosomen eindeutig reverse gebändert, jedoch nicht verwertbar wegen der zu schwachen Leuchtkraft.
Die höhere Konzentration von 2o mg/ml brachte bessere Ergebnisse hinsichtlich Trennschärfe, Chromosomenkontur und Leuchtkraft (Tab. 1o im Vergleich).
Den in Abbildung 14 aufgeführten Versuchsergebnissen wurde diese Konzentration (2o mg/ml) zugrundegelegt. Gleiches gilt für die Metaphase in Abbildung 15 (9o min Einwirkzeit von Chromomycin).

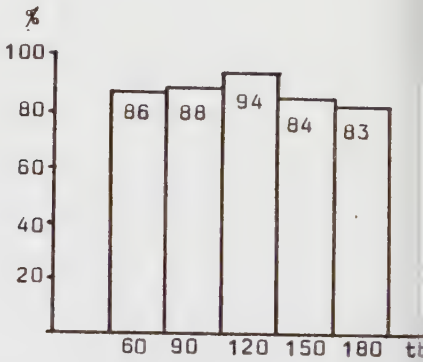
Tabelle 1o: Anteil R-gebänderter Metaphasen an der eingesetzten Gesamtzahl in Abhängigkeit von der Chromomycin-Einwirkzeit und dem Alterungsprozeß (in Klammern die Bänderungsrate in Prozent)

Zeit	frisch	1 Tag	2 Tage	2 Tage mit $MgCL_2$	2 Tage (1o mg/ml Methylgr.)
6o	24/3o (8o%)	26/3o (86%)	21/28 (86%)	8/1o (8o%)	4/6 (8o%)
9o	17/19 (89%)	15/17 (88%)	16/18 (88%)	8/9 (88%)	13/15 (8o%)
12o	15/17 (88%)	16/17 (94%)	15/16 (94%)	13/14 (92%)	9/11 (8o%)
15o	17/19 (89%)	16/19 (84%)	17/2o (85%)	-.-	-.-
18o	15/19 (79%)	15/18 (83%)	15/19 (79%)	-.-	-.-
Summe	1o4	1o1	1o1	35	32

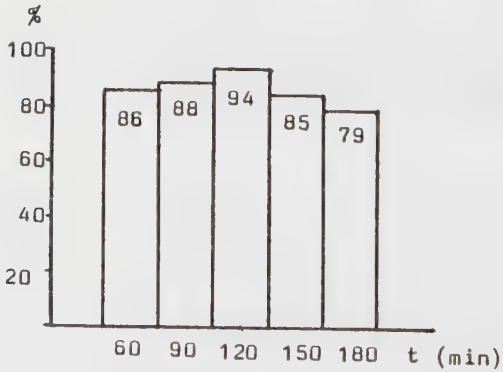
Abb. 14: Prozentualer Anteil R-gebänderter Metaphasen an der eingesetzten Gesamtzahl in Abhängigkeit von der Chromomycineinwirkzeit



frische Präparate



1 Tag alte Präparate



2 Tage alte Präparate

Empfohlenes Rezept beim R-banding:

1. Vorbehandlung:
   Frische Präparate (3o sec bei 25o C), bei älteren Präparaten keine Vorbehandlung.
2. Färbung:
   4 Tropfen Chromomycin A_3 auf das Präparat auftropfen, Deckglas auflegen und 9o-12o min (frische, 1 und 2 Tage alte Präparate) in eine dunkle Schale liegen lassen.
   Objektträger je 1 min in 2 Kuvetten mit Sörensonpuffer (pH 6,7) spülen.
3. Gegenfärbung:
   Methylgrün Gebrauchslösung (2-3 ml) für 4 min auf den Objektträger geben. Farbe abschütteln, zweimal in Glycerin (Merck) tauchen, Glycerin abschütteln und Deckglas draufgeben (luftblasenfrei).

Ansatz der Gebrauchslösungen:

1. Chromomycin A_3: 1 mg (Sigma) in 2 ml Sörensonpuffer, pH 6,7 (wie beim G-banding) ca. 1 Std. unter Bewegung lösen.
2. Methylgrün: 2o mg (Sigma) in 3o ml Puffer, pH 4,2 (o,o1 M NaAC und o,o1 M NaCl, 1+1) lösen, dazu 3o ml Hepes Puffer, pH 7 (o,1 M Hepes (Gibco) und o,1 M NaCl, 1+1, pH mit 1 n HCl einstellen) geben.

Zu beachten:
Die Farblösungen sind lichtempfindlich.

Abb. 15: Reverse-banding
(frisches Präparat, 9o min Chromomycin-Einwirkdauer)

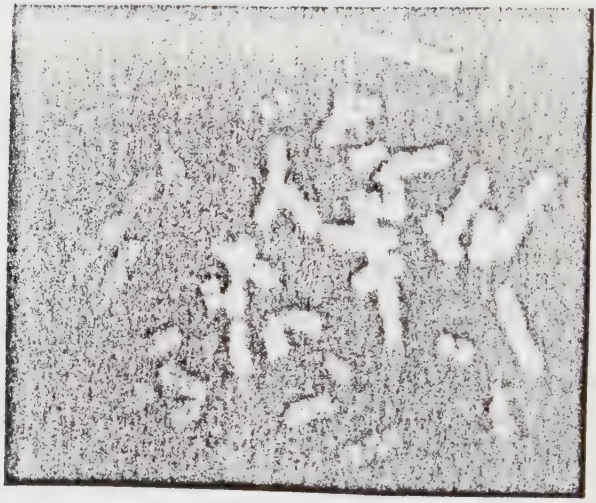


Abb. 16:

Q-banding
(frisches Präparat)

Giemsa-"Zweitbänderung"
(gleiches Präparat)

5.2.6. Q - banding

Die Quinacrine-Färbung erwies sich als problemlos. Von 32 Metaphasen wiesen 29 eine Q-banding auf (9o%). 2 Metaphasen waren homogen durchgefärbt, 1 Metaphase zu schwach gebändert.
Es handelte sich hierbei durchweg um frische Präparate (3o sec bei 25o C).
Die deutlich unterscheidbaren hell, mittel und schwach fluoreszierenden Banden ergaben ein chrakteristisches Muster (Abb. 17). Wegen der großen Lichtempfindlichkeit des Quinacrine empfahl es sich, die Untersuchungen in einem abgedunkelten Raum vorzunehmen. Während der Beobachtung ließ die Fluoreszenz der Chromosomen nach, so daß man sofort photographieren mußte.
Lange schmale Chromosomen wiesen mehr Banden auf als kurze gestaute Chromosomen. Langsam fixierte Metaphasen zeigten eine stärkere Leuchtkraft.
Die Giemsa-"Zweitbänderung" führte bei 3 Metaphasen zum Erfolg (s. Abb. 16). 2 Metaphasen waren zwar gebändert, aber für die Auswertung unbrauchbar geworden (durch das Trypsin zerdaut, aufgequollen).

Empfohlenes Rezept beim Q-banding:

1. Vorbehandlung:
   frische Präparate (3o sec bei 25o C), sonst keine Vorbehandlung.
2. Färbung:
   In Quinacrin-Mustard Gebrauchslsg. für 5 min (5 mg QM, Sigma, in 1o5 ml aqua dest., 4 C).
3. Kurzes Spülen in Sörenson's Phosphatpuffer, pH 6,7 (s. 4.2.1.).
4. Trocknen des Objektträgers zwischen 2 Kleenextüchern, (vorsichtig!).

5. Einlagerung in einer (1+1) Mischung von Glycerol und Sörensonphosphatpuffer, pH 6,7.

Zu beachten:
Die große Lichtempfindlichkeit des QM.

Abb. 17: Q-banding (frisches Präparat)

6. D I S K U S S I O N

6.1. Präparatherstellung nach der "Pipettenmethode"

Die Aufarbeitung kann beginnen, sobald die ersten Mitosen in der Kultur auftreten.
Der erste Schritt ist die Vorbehandlung mit Colcemid (Demecolcine). Seine Wirkung beruht auf die Hemmung des Spindelapparates. Dieser ist zum größten Teil aus Microtubuli aufgebaut, die durch Colcemid spezifisch inaktiviert werden (TAYLOR, 1965). Auf diese Weise werden die wachsenden Zellen in der Metaphase arretiert und hierdurch die Mitosenzahl erhöht.

Die optimale Einwirkdauer des Colcemid ist eine Frage der Konzentration: bei einer niedrigeren Konzentration als in den vorliegenden Versuchen (o,3 ug/ml) müßte eine längere Einwirkdauer des Colcemid gewählt werden.

Die Reversibilität der Colcemidwirkung zeigt sich durch das ungestörte (Weiter-)Wachstum der Kultur nach zweimaligem Mediumwechsel (BISHUN et al., 197o).

Der zweite Schritt ist die Identifizierung der Mitosen. Im Hinblick auf die Auswertbarkeit der Mitosen für eine Chromosomenanalyse wird das Stadium der Metaphase angestrebt.
Speziell in diesem Stadium nehmen die Zellen eine Kugelform an. Dies erklärt die Erkennungsmerkmale "runde Form, große Randschärfe, leichte Ablösbarkeit".
Frühere Stadien sind u.U. "fast rund". Beim Versuch sie mit der Pipette aufzusaugen, haften sie mehr oder weniger an dem Boden der Petri-Schale fest.

Lädierte Zellen (s.unten) flottieren zwar frei, sind aber entrundet.
Die Lage der Mitosen hängt von der Klongröße ab:

Bei größeren Klonen sind sie fast ausschließlich am Rande anzutreffen. Durch die Zelldichte im Zentrum werden Kontaktinhibitoren wirksam, die ein weiteres Wachstum dort verhindern (HOEHN et al., 1974, 1975). Bei kleineren Klonen finden sich die Mitosen über den gesamten Klon verteilt.

Als dritter Schritt kommt der hypotone Schock.
Im Hinblick auf den später zu untersuchenden Karyotyp ist eine qualitativ ausreichende Spreitung der Chromosomen erwünscht. Dies ist nur durch eine deutliche Größenzunahme der Mitose in der hypotonen Lösung gewährleistet.

6.2. Bänderungstechniken nach Aufarbeitung mit der "Pipettenmethode"

6.2.1. G-banding

Zur Herstellung von G-Banden sind eine Vielfalt von Behandlungsverfahren möglich, z.B. Alkalidenaturierung (siehe COMINGS et al., 1973), Pufferinkubation (siehe STENGEL-RUTKOWSKI et al., 1976) oder, wie in den vorliegenden Versuchen, Behandlung mit proteolytischen Enzymen.
Anschließende Giemsafärbung führt zu Giemsabandenmustern. Dies zeigt, daß Giemsa-Banden relativ unspezifisch durch vielerlei Denaturierungsmaßnahmen zu erhalten sind. Die Qualität jedoch ist oft inkonstant.

Die hier beschriebene Methode erweist sich dagegen als problemlos und sehr gut reproduzierbar. Sie eignet sich daher gut für die pränatale Diagnostik.
Im hiesigen Labor wird das Originalrezept routinemäßig im Zusammenhang mit der "Trypsinierungstechnik" angewendet. Bei der "in situ" Technik ist auf Grund der

hohen Zelldichte im Klon ein G-banding mittels Trypsin qualitativ problematisch, da eine ausreichende Qualität nicht mit der notwendigen Sicherheit erzielt werden kann.

Aus den Ergebnissen ergibt sich eine im Vergleich zu der "Trypsinierungstechnik" beträchtliche Verkürzung der Trypsineinwirkzeit (17-2o Sekunden anstatt 1 1/2 Minuten, nach SEABRIGHT (1971) modifiziert). Ansonsten müssen keine Änderungen zur auf die "Trypsinierungstechnik" angepaßten G-banding Methode vorgenommen werden.

Es stellt sich die Frage, weshalb die Dauer der Enzymbehandlung derart verkürzt werden muß.

Die Ursache liegt vermutlich in der unterschiedlichen Fixationsgeschwindigkeit und Fixationsdauer. Diese sind durch die verschiedenen Aufarbeitungstechniken bedingt:

- Bei der "Trypsinierungstechnik" gibt man die Fixationslösung tropfenweise den Zellen hinzu. Wenn man nach Zentrifugation den Überstand absaugt, kann dieser Vorgang (je nach Laborgewohnheit) mehrfach wiederholt werden.
- Bei der "Pipettenmethode" wird die Fixationsflüssigkeit kurz und schnell angesaugt (s. 2.3.). Es ergibt sich also eine schnellere Fixationsgeschwindigkeit im Vergleich mit der "Trypsinierungstechnik".
- Bei der "Trypsinierungstechnik" setzt sich die Fixationsdauer aus dem vorhin beschriebenen Fixationsvorgang und dem anschließenden Verweilen der Mitosen in der Fixlösung zusammen (z.B. 15 Minuten, KLINGER, 1972; mindestens 12 Stunden, SIT, 198o).
- Bei der "Pipettenmethode" werden die Mitosen sofort nach dem Fixieren aufgetropft und weiter verarbeitet.

Das bedeutet eine relativ kurze Fixationsdauer.

Es besteht ein offensichtlich fließender Übergang zum C-banding (s. 6.2.2.). Durch Übertrypsinierung werden alle Chromosomenstrukturen bis auf die Zentomerregion zerstört (nach BURKHOLDER, 1975). Elektronenmikroskopische Untersuchungen belegen dies (s. BURKHOLDER, 1975, COMINGS et al., 1973):
Werden durch ein beliebiges Behandlungsverfahren weniger als 9% der chromosomalen DNA denaturiert, erhält man ein G-Bandenmuster. Beim C-banding muß ca. 60% der DNA denaturiert werden.
Über die Ursache der Bandenentstehung besteht bis heute noch Unklarheit. Nach SUMNER (1973) spielt die wechselnde Proteindisulphid- und Sulphydrylkonzentration innerhalb eines Chromosomens eine Rolle:
Dunkle Banden besitzen einen hohen Anteil an Disulphiden, blasse Banden einen hohen Anteil an Sulphydrylen.
BURKHOLDER (1975) beschreibt die G-Bandenentstehung im Elektronenmikroskop als "elektron dense regions of highly packed chromoation fibres". Die Zwischenbanden zeigen im EM eine viel geringere Dichte. Die G-Banden entsprechen mehreren Chromatinverteilungsgraden in Abhängigkeit von Trypsineinwirkzeit und spezifischer Empfindlichkeit.
Weiterhin werden als Ursache für die Bandenentstehung die Sekundärstruktur der DNA, die Kernproteine, der Basengehalt der DNA, die Basenrepetition und die Entfernung der H_1-Histone durch den Denaturierungsprozeß angegeben (siehe BURKHOLDER, 1975).
In einem Punkt stimmen alle Autoren überein:
Die G-positiven und G-negativen Banden behalten eine konstante Lage bei. Dies gilt für den gesamten Kondensationsprozeß, i.e. beim Durchlauf der verschiedenen Stadien des Zellzyklusses.
Die stabilisierende Wirkung von Hitze (Vorbehandlung

mit 3o Sekunden bei 25o C oder mindestens 24 Stunden bei 7o C) auf die Chromosomenstruktur gilt prinzipiell auch für andere Bandingtechniken.
Durch diese Vorbehandlung strebt man eine Denaturierung der DNA an. Sie ist durch Aufbewahren in Raumtemperatur nicht zu erreichen (siehe COMINGS et al., 1973).

Bei längerem Alterungsprozeß reagiert das Chromosom unempfindlicher auf die Enzymbehandlung mit Trypsin (s. Tabelle 1 und Abb. 5).

Längere Chromosomen bringen mehr Information, da man weitere Substrukturen erkennen kann. Nach YUNIS et al. (1978) besteht eine Korrelation zwischen Länge und Zellteilungsstadium. So sind z.B. Chromosomen aus der späten Prophase fast zweimal so lang wie diejenigen aus der Metaphase. YUNIS et al. (1979) unterteilt die für die Auswertung relevanten Phasen wie folgt:
1. späte Prophase,
2. Prometaphase,
3. frühe Metaphase,
4. Metaphase,
5. späte Metaphase.
Er beobachtet ein ziemlich umgekehrtes Verhältnis zwischen Chromosomenlänge und Breite. So entsprechen die kurzen, gestauchten Chromosomen der späten Metaphase.

Für die bessere Qualität bei schnellem Fixieren besteht zur Zeit keine ausreichende Erklärung, bei der "Pipettenmethode" ist die Zeitdifferenz zwischen schnellem und langsamem Ansaugen der Fixationslösung minimal.

6.2.2. C-banding

Färbeverfahren zur Markierung der Zentromerregion leiten sich von Methoden zur Darstellung von anderen Bandenmustern ab. Oftmals genügt eine aggressive Variante der jeweiligen Technik, um nur noch C-Banden persistieren zu lassen (COMINGS et al., 1973).
In diesem Sinne beschreibt BURKHOLDER (1975) ein C-banding Verfahren durch Übertrypsinierung.

Das ursprüngliche C-banding Verfahren nach SUMNER (1972) hatte bereits einige Änderungen erfahren. Es mußte an die im hiesigen Labor routinemäßig angewandte "Trypsinierungstechnik" angepaßt werden:

- Die Wasserbadtemperatur der $Ba(OH)_2$-Lösung war um 5°C auf 50°C heraufgesetzt worden,
- die Denaturierungszeit war von 4-5 min auf 1/2-1 min verringert worden,
- das Sörenson Puffer zur Spülung nach der 2 SSC-Renaturierung war durch aqua dest. ersetzt worden,
- die Giemsafärbezeit war um 1/2 Std. verlängert worden,
- nach SUMNER (1972) war ein Alterungsprozeß von 1 Woche empfehlenswert. Nach dem modifizierten Rezept für die "Trypsinierungstechnik" wurden 2-3 Tage alte Präparate vorausgesetzt.

Die "Pipettenmethode" bringt ihrerseits nur 2 zusätzliche Änderungen mit:

- Die Behandlungsdauer mit $Ba(OH)_2$ muß noch einmal um 15 sec verringert werden. Sie erweist sich als der einzige kritische Schritt in den beschriebenen Untersuchungen.
- Die $Ba(OH)_2$-Einwirkzeit richtet sich nicht nach dem Alter der Präparate (es können auch frische Präparate gebändert werden). Dies gilt trotz gegenteiliger Literaturangabe (s. SUMNER, 1975), wonach bei frisch hergestellten Präparaten kein C-banding zu erzielen ist.

Die Darstellung des Heterochromatins wird durch eine langsame Fixation gefördert. Diese Beobachtung hat DUTRILLUAUX schon 1974 gemacht. Dennoch bleibt hier die Fixationsqualität bei 15 Sekunden $Ba(OH)_2$ offenbar ohne Einfluß. Das unterstreicht den schonenden Charakter der in dieser Zeitspanne erfolgten Denaturierung. Dies gilt insbesondere im Hinblick auf die ungebänderte restliche Chromosomenstruktur.

Es bleibt die Frage, weshalb diese Modifikation notwendig war. Auch hier wird die Ursache hauptsächlich in den unterschiedlichen Präparationstechniken liegen, i.e. in der durch die "Pipettenmethode" bedingten viel kürzeren Fixationsdauer und Fixationsgeschwindigkeit (s. 6.2.1.).

In der pränatalen Diagnostik hat die C-Bandentechnik ihren festen Platz. Im hiesigen Labor dient sie als Zweitbänderung, insbesondere zur Abklärung unklarer Befunde im Zentromerbereich:
Es kommt immer wieder vor, daß von den C-Banden markierte Abschnitte verdoppelt oder verdreifacht sind. Diese Normvarianten sind bei konventioneller Färbung nicht immer von Deletionen, Duplikationen oder unbalancierten Translokationen zu unterscheiden (STENGEL-RUTKOWSKI, 1976).
Als Ursache für das C-banding erwägen COMNINGS et al. (1973) die Interaktion bestimmter DNA-Proteine im Zentromerbereich. Im Gegensatz dazu würden die empfindlichen Chromosomenarme durch Denaturierung ihrer DNA ihr Bänderungsvermögen verlieren.
BURKHOLDER (1975) und STENGEL-RUTKOWSKI (1976) vermuten einen selektiven Chromatinverlust außerhalb der intakt bleibenden Zentromerregion. Dies wird durch elektronenmikroskopische Untersuchungen bestätigt.

Bei dem sogenannten C-Heterochromatin handelt es sich

um hoch repetitive DNA, in der die gleiche Basensequenz mehrfach hintereinander wiederholt wird. Damit wird die erhöhte Widerstandskraft gegenüber dem Denaturierungsverfahren erklärt (s. CRAIG HOLMES et al., 1973). In einer statistischen Erhebung bestätigen BROWN et al. (198o) das häufige Vorkommen von Polymorphismen in der Normalbevölkerung. Sie haben folglich keinen Krankheitswert (CRAIG HOLMES et al., 1973).
Auf der PARIS CONFERENCE (1971) war festgelegt worden, daß die C-Bande am proximalen Teil der langen Arme lokalisiert ist. Abweichend davon zeigen die Chromosomen 1, 9 und 16 sowie die Gruppe D und G auch Markierungen an dem proximalen Teil der kurzen Arme (KENZIE und LUBS, 1975).
1973 entdeckt CRAIG HOLMES 31 Variationen bei 2o Personen. Er beschreibt, wie in 2 Familien jeweils die Hälfte der 6 Variationen auf die Nachkommen vererbt wird.
Es werden Teil- und Totalinversionen beschrieben, wobei im ersten Fall ein Teil der C-Bande auf den kurzen Arm übergreift. Im zweiten Fall bleiben die langen Arme von der C-Markierung völlig ausgespart (s. BUCKTON et al., 1976).

6.2.3. CT / T-banding

Im Rahmen der Pränataldiagnostik bietet das CT/T-Bandenmuster den Vorteil, daß zusätzlich zum C-banding die terminalen Enden der Chromosomen differentiell angefärbt werden. Auf diese Weise können die Chromosomen sofort identifiziert werden. Bei ausschließlichem C-banding ist eine Karyotypisierung nur nach einer weiteren Bänderung, z.B. mit Giemsa, möglich.

Zudem kann man anhand der T-Banden in Translokationschromosomen Bruchstücke erkennen, die in den Chromosomenenden liegen.
Die oben aufgeführten Untersuchungen fanden in enger Anlehnung an SCHERES (1975) statt.
Anhand von postnatal gewonnenen peripheren Blutzellen (Lymphozyten) hat er ein Reverse- und ein CT-banding Verfahren entwickelt. Der einzige Unterschied zwischen beiden Methoden beruht auf einen zusätzlichen Zwischenschritt beim CT-banding (Inkubation in 2 SSC-Lösung).
Mit einer leichten Modifikation hinsichtlich der $Ba(OH)_2$-Einwirkdauer (1 1/2 min statt 4o min) kann man mit der "Trypsinierungstechnik" Reverse-Banden darstellen.
Entsprechend den Ergebnissen von SCHERES (1975) ist der Zwischenschritt entbehrlich. Die postnatal eingesetzte Aufarbeitungstechnik (Suspensionstechnik) von SCHERES (1975) stimmt in etwa mit der pränatal angewandten "Trypsinierungstechnik" überein: Fixationsgeschwindigkeit und Fixationsdauer sind ungefähr gleich. So läßt sich die notwendige Änderung bei Anwendung der "Trypsinierungstechnik" am ehesten durch die verschiedenen Zellzypen erklären: Amnionzellen reagieren anders als Lymphozyten.

Auf der Grundlage dieses Rezeptes kann bei der "Pipettenmethode" kein Reverse-banding erzielt werden. Stattdessen kristallisiert sich ein C-T- Bandenmuster heraus. Allerdings müssen, wie aus den Ergebnissen zu ersehen ist, erhebliche Änderungen vorgenommen werden:

Die Wasserbadtemperatur der $Ba(OH)_2$-Lösung wird auf 4o C verringert, ebenso die Denaturierungszeit (auf 4o sec).
Die S.A.Konzentration wird auf o,o5% erhöht (statt o,oo5%).

Das C-T- Bandenmuster ist 1974 von SCHERES beschrieben worden. Er hat es durch Inkubation in 2 SSC bei 6o C im Anschluß an eine $Ba(OH)_2$-Inkubation (1o min bei 6o C) erhalten. Das sind Bedingungen, die keine nach der "Pipettenmethode" aufbereitete Metaphase je überstanden hätte.
Der wesentliche Unterschied zu der von SCHERES beschriebenen Methode besteht in dem Verzicht auf das 2 SSC. SCHERES (1975) macht gerade diese Substanz für die Renaturierung und damit Anfärbbarkeit der Zentromerregion nach der erfolgten Denaturierung in $Ba(OH)_2$ verantwortlich.

Der Grund, weshalb man mit der "Pipettenmethode" kein Reverse erreichen kann, der Grund, weshalb man stattdessen ein C-T- banding erhält, obwohl dies mit Lymphozyten nach Aussagen des Autors nicht möglich ist, kann nur in der unterschiedlichen Präparationstechnik liegen. Die Ursache liegt kaum in den verschiedenen Zellarten (Amnionzellen bzw. Lymphozyten):
Anhand der "Trypsinierungstechnik" sieht man, daß die Methode nach SCHERES auch mit foetalen Zellen funktionieren kann.
Auch hier kann man wieder auf die viel kürzeren Fixationsgeschwindigkeiten und Fixationszeiten bei Anwendung der "Pipettenmethode" hinweisen.

Im Rahmen des routinemäßigen Einsatzes für die Pränataldiagnostik können auch frisch aufbereitete Mitosen gebändert werden. Dies ist ein Fortschritt (Zeitgewinn) gegenüber dem Originalrezept, denn SCHERES setzt einen Alterungsprozeß von 2-3 Tagen voraus.

Über die Entstehung der C-T-Banden herrscht noch Unklarheit. Für DUTRILLAUX und COVIC (1974) entsprechen die G, R, T'und C-Banden einer progressiven Zerstörung der chromosomalen Struktur. DE LA CHAPELLE et al. (1973) vermuten, daß die Telomerbandenregion ein gegen Hitze

und Alkali besonders widerstandsfähiges Chromatin enthält. Nach SCHERES (1975) verändert der Denaturierungsprozeß den Nukleinkomplex derart, daß Proteine die DNA der Zwischenbandenregion bedecken. So ist diese für Farbmoleküle nicht mehr erreichbar. Im Lichtmikroskop erscheinen sie dann als helle ungefärbte Banden bzw. Chromosomenarme.

SCHERES (1975) beobachtet, daß bei frischen Präparaten eher ein C-banding, bei älteren Präparaten ein T-banding überwiegt. Dies kann in den vorliegenden Untersuchungen nicht bestätigt werden. Bei der zum Teil unregelmäßigen Bänderung ist keine Gesetzmäßigkeit erkennbar.

Bezüglich der Denaturierungsdauer fällt die bauchige Verteilungskurve (Abb. 8) auf. Für das banding scheinen die Temperaturdifferenzen der $Ba(OH)_2$-Lösung ausschlaggebender zu sein, als geringfügige zeitliche Unterschiede bezüglich der Denaturierungsdauer.

6.2.4. NOR - Darstellung

Im Rahmen der Pränataldiagnostik kann die Silberfärbung zur Abklärung von Polymorphismen im Bereich der kurzen Arme der Chromosomen der D- und G-Gruppe eingesetzt werden.

Im hiesigen Labor wird das Originalrezept von BLPOM und GOODPASTURE (1976) bei der "Trypsinierungstechnik" angewendet.

Die vorliegenden Untersuchungsergebnisse zeigen, daß die "Pipettenmethode" mehrere Änderungen der ursprünglichen NOR-Bänderungstechnik fordert:

- Bei normalen Auftropfpräparaten ("Trypsinierungstechnik") spielt das Alter der Präparate keine Rolle (mindestens 2 Std. , BLOOM und GOODPASTURE, 1976).
  Bei der "Pipettenmethode" muß der Alterungsprozeß mindestens 2 Tage betragen.

- Bei der"Pipettenmethode" müssen die Präparate ca. 6 mal so lange (72 Std.) in der Silbernitratlösung inkubieren, um akzeptable Ergebnisse zu erhalten.
- Eine anschließende Färbezeit von 5-1o sec reicht für die "Pipettenmethode" nicht aus. Erst bei 13-14 sec ist eine Anfärbung der Chromosomenarme gewährleistet.

Die mit der "Pipettenmethode" aufgearbeiteten Amnionzellen reagieren unempfindlicher als die mit der "Trypsinierungstechnik" aufgearbeiteten Zellen. Dies steht im Gegensatz zu den bisher gemachten Erfahrungen, (bei der "Pipettenmethode" muß z.B.für ein G-banding die Trypsinierungszeit, für ein C-banding die $Ba(OH)_2$-Einwirkdauer kürzer sein als bei der "Trypsinierungstechnik", s. 6.2.1. und 6.2.2.).

Die Ursache dieser notwendigen Modifikationen muß in den unterschiedlichen Präparationstechniken gesucht werden. Mit der "Pipettenmethode" ist eine weit kürzere Fixationsgeschwindigkeit und Fixationsdauer als mit der "Trypsinierungstechnik" verknüpft.

Bei der "Pipettenmethode" lassen sich NORs vor allem bei langsamer fixierten Chromosomen markieren. Dafür kann zur Zeit keine ausreichende Erklärung gegeben werden.

BLOOM und GOODPASTURE (1976) kommen bei ihren Auftropfpräparaten zu folgendem Schluß: Das Optimum der Fixationsdauer soll bei 2o-3o min liegen. Das wäre ein Vielfaches von der durchschnittlichen Fixationszeit bei der "Pipettenmethode".
Den NORs liegt eine selektive Markierung der "Nucleolus Organizer Region" durch das Silber zugrunde. Schon seit einigen Jahren weiß man, daß diese NORs den chromosomalen Sitz der RNA-Transkriptase repräsentieren (s.GOOD-

PASTURE und BLOOM, 1975, HOWELL et al., 1975, MILLER et al., 1976).

Der Nukleolus setzt sich aus 3 Komponenten zusammen:

1. Das Chromatin, i.e. die NORs derjenigen Chromosomen, die in die r RNA Produktion eingespannt sind.
2. Eine mikrofibrilläre Komponente, die aus feinen (4o-8o A^{o}) ribonuklearen Proteinfibrillen aufgebaut ist.
3. Eine granuläre Komponente, die aus gröberen Proteinkörnern und Fibrillen besteht (HOWELL et al., 1975, MILLER et al., 1976).

Anscheinend jedoch werden nur jene ribosomalen Zistrone mit Silber markiert, die während der vorausgegangenen Interphase ribosomale RNA transkribiert haben. Zudem wird in der Prophase ein weit größerer Silberniederschlag beobachtet, als in der Meta- und Anaphase. Erst in der späten Telophase nimmt dieser wieder zu (s. SCHWARZMACHER et al., 1978).

Demnach spiegelt die Silberfärbung mehr die Funktion als nur die Anwesenheit der ribosomalen Gene wieder. So könnte die Menge des Silberniederschlags eine Aussage über die NOR-Aktivität erlauben (SCHWARZACHER et al., 1978).

Die Frage, welche chemische Gruppe mit dem Silber eine Bindung eingeht, ist noch nicht geklärt. Elektronenmikroskopische Untersuchungen haben gezeigt, daß die eigentliche argentophile Substanz nicht im Chromosomen selbst, sondern um die NORs lokalisiert ist. SCHWARZACHER et al. (1978) vermuten eine Proteinkomponente, die am aktiven NOR akkumuliert.

1981 greift GOTTERAND-BELLOMO das Problem der Schwankungen der dargestellten NORs noch einmal auf. Sie vermutet eine natürliche inter- und intrazellulare Variabilität der NOR-Aktivität. Im Gegensatz zu den inaktiven NORs vollziehen die aktiven NORs durchaus eine Aktivitätsänderung von einer Generation zur anderen. So kann von Zellreihe zu Zellreihe, auch innerhalb eines Klons, die Anzahl der dargestellten NORs unterschiedlich sein. Es kommen bis zu 9 NORs in einer Zelle vor (s. BLOOM und GOODPASTURE, 1976).

Ein Merkmal der Silbertechnik ist der beträchtliche Zeitaufwand von mindestens 5 Tagen, der nicht den Ergebnissen von BLOOM und GOODPASTURE (1976) entspricht. Sie erzielen schon nach 14-2o Std. positive Ergebnisse. Sie arbeiten allerdings mit peripher gewonnenen Lymphozyten und mit einer anderen Präparationstechnik.

OLERT et al. (1979) stellen fest, daß bei einem pH-Wert zwischen 4,9 und 5,2 die Silberverbindung an die NORs optimal ist. Dies entspricht dem pH einer $AgNO_3$-Lösung bei 37 C. Somit ist gleichzeitig die Wirkung der Inkubation im CO_2-Brutschrank erklärt, der zu einem sauren pH-Wert des über 1 Std. eingebrachten aqua dest. führt (s. 5.2.4.) .

6.2.5. Reverse-banding
6.2.5.1. Acridin-Orange Färbetechnik
6.2.5.1.1. Metrotrexat und BrdU

Zur Synchronisation von Zellkulturen werden Amepthopterin (Methotrexat) und BrdU in der Zytogenetik häufig eingesetzt (DUTRILLAUX et al., 1981).

MTX (4-amino N^{1o}-methylpteroylglutaminsäure) gehört als Folsäureantagonist in die Reihe der Antimetabolite. Es hemmt kompetiv die Dihydrofolat-Reduktase und inhibiert so die DNA- und RNA-Synthese.

Exponentiell wachsende Zellkulturen werden durch Gabe dieses Folsäureantagonisten in ihrer Thymidinsäure-Synthese gehemmt. Dieser Mangelzustand verursacht einen Wachstumsstop. Beides wird durch Entfernen des MTX und subsequente Mediumanreicherung mit einem Thymidinanalogon (z.B. 5-bromodeoxyuridin) aufgehoben (s. COORTLAND WHITE, 1981).

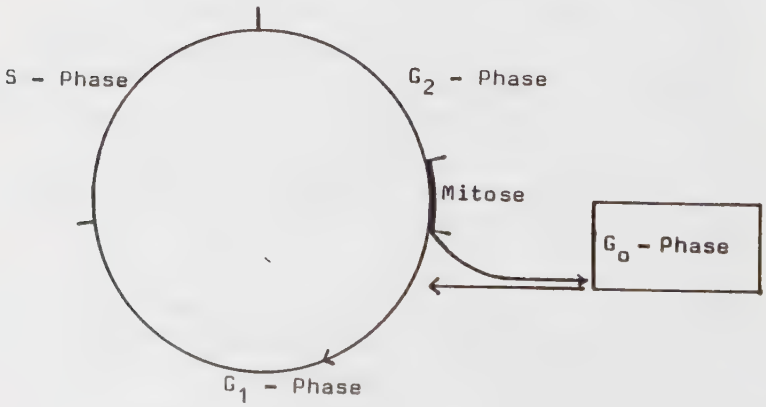
CARMARGO et al. (198o) und FRIEDLAND (1975) vermuten, daß der Methotrexatblock in einem fortgeschrittenen Stadium der S-Phase stattfindet (s. Abb. 18). Nach Thymidinsubstitution wächst die Zellpopulation synchron bis zum Stadium der Metaphase weiter.

Untersuchungen an Lymphozyten zeigen, daß die durchschnittliche Dauer der S- plus G_2-Phase 9 Std. beträgt (s. CAMARGO und CERVENTA, 198o). Dementsprechend wird der höchste Mitoseindex nach BrdU-Inkorporation bereits nach 5 Std. (s. CAMARGO et al., 198o, YUNIS, 1981) bzw. nach 6-7 Std. (s. DUTRILLAUX et al., 1981) erreicht.

Dies steht im Widerspruch zu den vorliegenden Ergebnissen: Bei den foetalen Zellen wird der höchste Mitoseindex nach 1o-12 Stunden erreicht.

Das läßt sich am ehesten durch eine längere S - G_2 Phasendauer bei Zellkulturen aus Amnionzellen erklären. Wenn man annimmt, daß der MTX-Block in der späten S-Phase eingreift, müßte die S - G_2 Phasendauer etwa 15 Std. betragen.
Ebenso kann man die Ergebnisse von YUNIS et al. (1978) noch einmal aufgreifen. Sie legen den Angriffspunkt des MTX auf einen früheren Zykluszeitpunkt (zwischen G_1 und S).
Unter diesen Voraussetzungen und bei einer angenommenen S - G_2Dauer von 9 Std. (s.oben) wäre der hohe Mitoseindex 1o-12 Std. nach dem MTX-Block plausibel. Da der Mitoseblock nur einen (kleinen) Teil der Zellpopulation erfaßt, sollte weniger von einer Synchronisationstechnik als vielmehr von einer Teilsynchronisationstechnik gesprochen werden (SCHEMPP und VOGEL, 1978).
Die toxische Wirkungskomponente der Kombination MTX und BrdU wird von DUTRILLAUX et al., (1981) bestätigt. Sie könnte in Zusammenhang mit der Desintegration von Klon 1 aus der Kultur B stehen (s. Tab. 7 und 5.2.5.1.)

Abb. 18: Zellzyklus nach HEROLD (1981), modifiziert.



6.2.5.1.2. Acridin - Orange
Zunächst geht es um die Frage, welche Zellsynchronisationstechnik bessere Ergebnisse bringt. Die Kombination von MTX-Block und Thymidinsubstitution (6.2.5.1.1.) ist dem alleinigen Einsatz von BrdU geringfügig überlegen. Diese Kombination hat jedoch häufig Endomitosen zur Folge. YUNIS et al. (1978) zählen einen Chromosomenbruch auf 3o Mitosen.

Über die Wirkung von BrdU besteht noch Unklarheit. MEUTH und GREEN (1974), SCHEMPP et al. (1978) vermuten einen DNA-Block. Es soll ähnlich dem Thymidinblock des Folsäureantagonisten MTX durch Synthesehemmung von Deoxycytidin funktionieren.

BrdU wird auch für sich alleine zur Synchronisation von Zellpopulationen im pränatalen Bereich eingesetzt: so z.B. in der AARHUS UNIVERSIÄT (Dänemark), dessen Originalrezept aus dem Jahre 198o als Vorlage genommen wurde. Hier werden die besten Resultate bei einer BrdU Einwirkzeit von ca. 7 Std. erzielt. Dies steht im Gegensatz zu den vorliegenden Untersuchungen, bei denen keine Zeit oder Zeitspanne besonders herausragte.

In postnatalen Untersuchungen an peripheren Lymphozyten beschreibt DUTRILLAUX (1981) eine weitere nützliche Eigenschaft des BrdU:
Er benutzt es, um die Darstellung von R-Banden zu fördern. Die höchste Ausbeute erzielt er dabei nach 6-7 Std..
Die Annahme, daß speziell durch BrdU-Vorbehandlung R-Bandenmuster hervorgerufen werden können, wird von SCHOLL MAYER et al. (1981) geteilt. Auch er arbeitet mit postnatal gewonnenen p ripheren Lymphozyten.

Im vorliegenden Versuch kann diese Vorstellung jedoch nicht bestätigt werden. Nach Anwendung des Rezeptes von AAHRUS bei der "Pipettenmethode" können R-Banden nur vereinzelt dargestellt werden. Aus den Ergebnissen

geht hervor, daß in der von DUTRILLAUX (1981) empfohlenen Zeitspanne (6-7 Std. BrdU) die geringste Ausbeute an teilgebänderten Mitosen zu verzeichnen ist (s. Abb. 11).
Die Ursache liegt u.U. in den unterschiedlich langen Zellzyklen bei verschiedenen Zelltypen (s. 6.2.5.1.1.) DUTRILLAUX stellt postnatale Untersuchungen an peripheren Lymphozyten an. Währenddessen handelt es sich hier um Untersuchungen an Amnionzellen.

1966 befaßt sich RIGLER mit Acridin-Orange. Er stellt fest,daß diese Fluorochrome bei einer Bindung an doppelstrangiger DNA im grünen Bereich fluoreszieren. Bei einer Bindung an einstrangiger DNA fluoreszieren sie im roten Spektralbereich. Analog dazu stellt BOBROW (1973) folgende These auf:
Bei einer Denaturierung, die R-Banden hervorruft, wandelt sich die entsprechende DNA-Struktur von der doppelstrangigen zur einstrangigen Form um.
Dies läßt sich mit den Ergebnissen von VERMA und LUBS (1976) in Einklang bringen: Bei einer zu schwachen Denaturierung beobachten sie homogen gelb-grün leuchtende Chromosomen, bei einer zu starken Denaturierung homogen orange-rot leuchtende Chromosomen.
Auf die vorliegenden Resultate übertragen, heißt das, daß mit der "Pipettenmethode" gewonnene Mitosen ziemlich unberechenbar reagieren:
Trotz konstant gehaltener Versuchsbedingungen scheint das Auftreten von gelb-grün oder orange-rot leuchtender Banden bzw. Chromosomen an keine Gesetzmäßigkeit gebunden.
Die Wahrscheinlichkeit, den bei jeder Metaphase aus angezüchteten foetalen Zellen zum R-banding führenden Denaturierungsgrad zu treffen, ist daher eher gering.

In AAHRUS wird die A.O.-Technik im Rahmen der Pränataldiagnostik eingesetzt. Angaben zur Aufarbeitungstechnik fehlen hingegen. Im hiesigen Labor führt das Original-

rezept bei der "Trypsinierungstechnik" jedoch durchaus zum Erfolg (JERSMANN, 1983). Es stellt sich die Frage, weshalb dies bei der "Pipettenmethode" nicht der Fall ist.
Auch hier wird eine Ursache in den unterschiedlichen Fixationszeiten und Fixationsgeschwindigkeiten bei den beiden Aufarbeitungstechniken liegen.
Der wesentliche Grund für die geringe Bänderungsrate wird jedoch in einem insgesamt zu kurzen Alterungsprozeß zu suchen sein. WYENDT et al. (1973) können erst bei 2-3 Wochen alten Präparaten optimale Resultate erzielen. Sie postulieren, daß sich an jüngeren (z.B. 2-3 Tage alten) Präparaten mit der A.O.-Technik keine R-Banden darstellen lassen.
Gleiches berichten VERMA und LUBS (1976):
Selbst 24 Std. bei 6o C oder in Fixationslösung vermögen das negative Ergebnis nicht zu ändern. Sie erhalten höchstens vereinzelte R-Banden und sehr schnell ablassende Fluoreszenz. Das entspräche in etwa den vorliegenden Ergebnissen:

1. Unregelmäßiger Bänderungserfolg trotz konstanter Bedingungen,
2. kein Unterschied hinsichtlich dem Bänderungserfolg zwischen sogenannten frischen (5o sec bei 25o C), 1 und 2 Tage alten Präparaten.

So kann man annehmen, daß der Alterungsprozeß generell zu kurz angesetzt ist.
Die im Vergleich zu anderen Fluorochromen stärkere Fluoreszenz (Quinacrin, Methylgrün etc.) hat eine geringere Durchmusterungszeit im Mikroskop zur Folge. So können höchstens 1-2 Aufnahmen gemacht werden (s.PAI und THOMAS, 198o).

Schlußfolgernd läßt sich sagen, daß die A.O.-Technik selbst bei guter Qualität für die "Pipettenmethode" nicht in Frage kommt. Mit einer möglichen Wartezeit von 2-3 Wochen genügt diese Methode nicht dem Prinzip schneller Ergebnisse.

6.2.5.2. Färbung mit Chromomycin und Gegenfärbung mit Methylgrün

Es erweist sich als problematisch, mit der "Pipettenmethode" Reverse-Banden bei foetalen Zellen darzustellen. Über ein R-banding speziell in der pränatalen Diagnostik steht nur wenig Literatur zur Verfügung.

Mit der "Trypsinierungstechnik" werden zunächst 3 verschiedene R-banding Verfahren getestet, alle ohne Erfolg (R-banding Methoden nach EIBERG, 1973, SEHESTED, 1974, PAI und THOMAS, 198o).
Erst mit dem Verfahren nach S.A. LATT (1981) gelingt es, mit der "Trypsinierungstechnik" Reverse-Banden bei foetalen Zellen darzustellen.
Dieses R-banding Verfahren ist wie die vorigen bisher nur an postnatalen Lymphozyten angewendet worden.
Es kann ohne Modifikation auf die "Trypsinierungstechnik" im pränatalen Bereich übertragen werden.

Bei der "Pipettenmethode" hingegen sind, wie aus den Ergebnissen ersichtlich, geringfügige Änderungen vorgenommen worden.

- Die von S.A. LATT (1981) angegebene Methylgrünkonzentration ist versuchshalber verdoppelt und wegen der größeren Leuchtkraft der R-Banden beibehalten worden.
- Der ursprüngliche Sinn und Zweck einer Zugabe von $MgCl_2$ zu der Chromomycin Stammlösung ist ungeklärt geblieben. So ist das $MgCl_2$ ohne erkennbare Qualitätseinbuße zur weiteren Vereinfachung weggelassen worden.

Mithin kann die Methode im großen und ganzen so übernommen werden. Unterschiedliche Fixationsgeschwindigkeiten und Fixationszeiten bei verschiedenen Aufarbeitungstechniken fallen offensichtlich nicht ins Gewicht. Auch der Alterungsprozeß mit mindestens 5o Sekunden bei 25o C beeinflußt nicht die Qualität der Bänderung (s.Abb 14).

Mit der Methode nach VERMA und LUBS (1974) muß dagegen mindestens 7-1o Tage, mit der nach DUTRILLAUX (1974) mindestens 8 Tage gewartet werden. Beide Methoden sind allerdings an postnatalen Zellen (Lymphozyten) entwickelt worden.
Auch die Einwirkdauer des Farbstoffes Chromomycin kann in dem gesteckten Rahmen von 9o-12o Minuten flexibel gewählt werden.
Es muß ein schwach saurer pH-Bereich eingestellt werden. DUTRILLAUX beschreibt 1974 die für ein Reverse-banding günstigste pH-Konstellation von 5,1 - 7,4. Die pH-Werte von 6,5 (Chromomycin) und 7,o (Methylgrün) liegen in diesem günstigen Bereich.

Die Chromomycin-Methylgrün Technik bietet vor allem zwei Vorteile gegenüber der Hitzedenaturierungstechnik von DUTRILLAUX et al. (1971). Sie ist viel einfacher und von nur wenigen Parametern abhängig. Dies ist für reproduzierbare Ergebnisse in der Pränataldiagnostik sehr wichtig.

Allerdings muß vermutlich eine Instabilität der angesetzten Lösungen konstatiert werden, da mit 5 Tage alten Gebrauchslösungen in 2 Fällen bei sonst gleichen Bedingungen keine Fluoreszenz erreicht werden konnte. Dies widerspricht LATT (1981), der eine mindestens einwöchige Haltbarkeit versichert.

Die Leuchtkraft der Mitosen kann schwanken und ist kurzlebig. Nach 1-2 Minuten UV-Bestrahlung ist die Metaphase verglüht. Es muß daher sofort photographiert werden.

SAHAR und LATT (1978) untersuchten den Mechanismus der Chromomycin-Methylgrün Reverse Bänderung. Es steht fest, daß das Bandenmuster durch einen Energietransfer zwischen sich ergänzenden "DNA-Farbstoffen" hervorgerufen wird. Dies geschieht in Abhängigkeit von der Basenzusammensetzung der chromosomalen DNA.

In photometrischen Messungen wird das Zusammenspiel der beiden Fluorochrome Chromomycin A_3 und Methylgrün untersucht (s. SCHWEIZER, 1981). Es findet sich eine spezifische Bindungsaffinität des Antibiotikums Chromomycin an das DNA-Basenpaar G-C sowie eine ebensolche Affinität des Methylgrün an das Basenpaar A-T. Bereits eine ausschließliche Inkubation von menschlichen Chromosomen mit dem Fluorochrom Chromomycin ergibt ein schwach leuchtendes reverse. Die Gegenfärbung mit dem nicht fluoreszierenden AT - spezifischen "DNA-Farbstoff" Methylgrün läßt das angedeutete Bandenmuster intensiver und differenzierter aufleuchten (SCHWEIZER, 1981).

Das Reverse-Bandenmuster mit Hilfe des Farbstoffpaares wird wie folgt bgründet: Reverse-Banden sind mit einer Prävalenz an G - C reichen DNA-Basensequenzen verknüpft (nach LATT, 1976; COMINGS, 1978; LATT, 1978).

Das R-banding kann zur Kontrolldarstellung schwach angefärbter G-Banden in der pränatalen Routinediagnostik dienen. Ebenso können zusätzliche chromosomale Substrukturen differenziert werden (STENGEL-RUTKOWSKI, 1976).

6.2.6. Q-banding

Das Q-banding ist die älteste Bänderungstechnik in der Zytogenetik. In den Anfängen der Pränataldiagnostik wird sie von ALFI et al. (1975) als beste Methode empfohlen, um chromosomale Polymorphismen aufzudecken.

Im hiesigen Labor wird sie routinemäßig mit der "Trypsinierungstechnik" eingesetzt.
Das Q-banding-Verfahren kann für die "Pipettenmethode" ohne Modifikation übernommen werden.

Da frisch aufgearbeitete Mitosen besonders empfindlich reagieren, werden sie bei Untersuchungen zur Adaption von Färbeverfahren an die "Pipettenmethode" eher zuletzt eingesetzt.

Diesmal wurden versuchshalber sofort frisch hergestellte Präparate eingesetzt, mit Erfolg. Schon auf dem ersten Präparat sind Q-Banden zu sehen. Offensichtlich gibt es kaum Fehlerquellen. Die Anzahl der zu beachtenden Parameter ist gering: Färbezeit, Quinacrinkonzentration, Einlagerungsmittel, Lichtempfindlichkeit.

Ebenso problemlos scheint auch bei der "Pipettenmethode" eine Kombination mit weiteren Färbetechniken möglich: Nach dem Q-banding wurde ein klassisches Giemsabanding angeschlossen, welches in jedem Fall ein positives G-banding ergab. Die teilweise mindere Qualität ist wahrscheinlich auf eine zu kurze Hitzebehandlung (i.e. DNA-Denaturierung) zurückzuführen. Eine "kurze" Hitzebehandlung durch eine Flamme läßt sich nur schlecht standardisiert durchführen. Die reproduzierbare Vorbehandlung von 3o Sekunden über 25o C könnte bei Bedarf sicherlich konstantere Ergebnisse liefern.

Das Q-banding läßt sich gut mit anderen Färbeverfahren kombinieren. BLOOM und GOODPASTURE (1976) berichten über eine anschließende NOR-Markierung mit Silber. MC KENCIE und LUBS (1975) beschreiben ein davor geschaltetes C-banding. NIIKAWA (1975) verknüpft das Q-banding mit einer anschließenden A.O.-Färbung.
Dies alles mit dem Ziel, mehr Information über chromosomale Polymorphismen an derselben Metaphase zu erhalten.
Das Fluorochrom Quinacrine Mustard zeichnet sich durch eine insgesamt geringe Bindungsspezifität innerhalb der chromosomalen DNA aus. Andererseits wird eine

charakteristische Fluoreszenzintensivierung in der A - T Basensequenz beschrieben (s. SCHWEIZER, 1981). Dies könnte die Ähnlichkeit mit dem Giemsa-Bandenmuster erklären (s. 6.2.1.).
In diesem Sinne würde das R/Q-Bandenmuster mögliche sich kompletierende Variationen der DNA-Basensequenz reflektieren (SCHWEIZER, 1981).

Für alle Fluoreszenztechniken gilt, daß genauere Untersuchungen nur an Photographien vorgenommen werden können. Dies beansprucht Zeit und ist kostenträchtig. Dieser Umstand gereicht gerade dem Q-banding Verfahren zum Nachteil:
Bei der "Trypsinierungstechnik" wie bei der "Pipettenmethode" sind mit Hilfe einer Nichtfluoreszenztechnik (Giemsa) gleichwertige Banden darstellbar..
Dies erklärt, weshalb in neuerer Zeit vornehmlich das Giemsabanding routinemäßig im Rahmen der Pränataldiagnostik eingesetzt wird.

6.3. Zusammenfassende Beurteilung der Bänderungstechniken nach Aufarbeitung mit der "Pipettenmethode"

In der vorliegenden Arbeit müssen zwei Schwierigkeiten bewältigt werden:

1. Der Aufarbeitungsmodus mit der Pipette,
2. das Arbeitsmaterial, die sehr empfindlichen Amnionzellen.

Literatur über Probleme der Bänderung von foetalen Zellen liegt kaum vor. Die als Ausgangspunkt gewählten Bänderungsmethoden sind alle an postnatalen peripheren Lymphocyten entwickelt worden. Einzelne Methoden haben bereits eine Anpassung an die "Trypsinierungstechnik" im hiesigen Labor erfahren. Im Rahmen der pränatalen Diagnostik werden das G-, das Q- und das C-banding sowie die NOR-Darstellung routinemäßig eingesetzt.

Im wesentlichen können die in den Publikationen vorgegebenen Rezepte übernommen werden.
Es müssen lediglich Modifikationen hinsichtlich einzelner Parameter vorgenommen werden (z.B. Denaturierungszeit, Färbezeit, Wirkstoffkonzentration etc.). Das Ausmaß der Änderungen verhält sich bei jedem Verfahren anders.
Bei C-T-banding sind z.B. doch beträchtliche Änderungen notwendig (s. 5.2.3). Das Q-banding hingegen kann ad hoc verwirklicht werden.
Der Bänderungserfolg ist abhängig von der Qualität der Präparate. Dieser läßt sich aber nicht in jedem Punkt einheitlich definieren. Es hängt von der jeweiligen Färbetechnik ab, ob sie besser an langsam oder schnell fixierten Metaphasen zu realisieren ist. Generell sind. langgestreckte Chromosomen auf Grund ihrer größeren strukturellen Differenzierbarkeit geeigneter.

6.4. Zusammenfassende Bewertung der "Pipettenmethode" im Vergleich zur "Trypsinierungstechnik" und zur "in situ" Technik

Mit Anpassung der wesentlichen banding-Verfahren an die "Pipettenmethode" ist der letzte Schritt für ihren routinemäßigen Einsatz innerhalb der pränatalen Diagnostik vollzogen.

In der Einleitung (2.) werden die konkurrierenden Techniken mit ihren Vor- und Nachteilen bereits im Detail beschrieben.
Daher sollen an dieser Stelle nur noch die wesentlichen Unterschiede herausgestellt werden:

1. Zeitgewinn: Im günstigen Fall wird die Diagnose bereits 4 Tage nach Amniozentese gestellt (s.STUTZ, 1983). Durchschnittlich sind 5-6 Tage zu veranschlagen.
   Dies steht im Gegensatz zu 13,4 Tagen bei der "in situ" Technik und 15,7 Tagen bei der "Trypsinierungstechnik" (s.THERKELSEN, 1971, NADLER und GERBIE, 197o).

2. Materialersparnis und geringe technische Voraussetzunge
   Durch kürzere Kultivierungsdauer wird Mediu gespart. Statt Kulturgefäße werden nur Petrischalen benötigt. Eine Ansaugvorrichtung am Arbeitsplatz ist nicht unbedingt erforderlich. Reagenzgläser und Trypsin-EDTA (bei der "Trypsinierungstechnik") sind überflüssig. Die notwendige Ausrüstung beschränkt sich im Grunde auf eine Mikropipette, einen Ansaugschlauch, ein Invertos sowie einen daran an- und abmontierbaren Mikromanipulator.

3. Weiterwachstum der Kultur:

Bei der Aufarbeitung geht praktisch kein Zellmaterial verloren und die Kultur kann ungestört weiterwachsen. Die Diagnostik ist in Problemfällen oder wegen äußerer Umstände (z.B. Bearbeitungsfehler) jederzeit wiederholt durchführbar.

4. Zuordnung der Mitose zu ihrem Klon:

Die Zuordnung ist bei der "Pipettenmethode" wie bei der "in situ" Technik möglich. Dies ist für die Mosaikerkennung von entscheidendem Vorteil.

5. Geringes Ausgangszellmaterial:

Bei den herkömmlichen Präparationstechniken (" in situ" Technik und "Trypsinierungstechnik") wird jeweils das gesamte Zellmaterial eines Kulturgefäßes aufgearbeitet.
In einem Arbeitsgang ist die Menge der aufgearbeiteten Metaphasen dementsprechend groß. Bei der "Pipettenmethode" hingegen kann in einem Arbeitsgang nur eine begrenzte Anzahl an Metaphasen (ca. 1-4o) auf einmal aufgearbeitet werden. Bei Untersuchungen mit Bänderungstechniken erfordert das methodenbedingte geringere Ausgangsmaterial dementsprechend einen größeren Arbeitsaufwand bis genügend Präparate für die Serienversuche hergestellt sind.

Die Adaption der banding-Techniken an die "Pipettenmethode" kann nun als vollzogen angesehen werden.

7. Z U S A M M E N F A S S U N G

Die "Pipettenmethode" ist ein neues Verfahren zur Chromosomenpräparation im Rahmen der pränatalen Diagnostik. Die gängigen Methoden zur Darstellung der Feinstruktur der Chromosomen (banding-Techniken) wurden an dieses Verfahren adaptiert.

G - banding:

1. Vorbehandlung:
   - frische Präparate (3o sec bei 25o°C)
   - 1 Tag alte Präparate (24 Std. bei 7o°C)
   - 2 Tage alte Präparate (48 Std. bei 7o°C)
2. Denaturierung:
   17-2o sec (frische Präp.)
   35-45 sec (1 Tag alte Präp.)
   35-5o sec (2 Tage alte Präp.) in Trypsin-Lsg.
   (Difco Bacto Trypsin, o,5 ml auf 7o ml physiol. NaCl-Lsg. auf 37°C im Wasserbad erwärmt)
3. Dreimal spülen in physiol. NaCl-Lsg.
4. Färbung:
   2-3 min in Giemsa-Lsg. (Fa. Merck, 3,5 ml in 6o ml Sörenson Puffer, i.e. 3o ml, 1/15 M KH_2PO_4-Lsg. + 3o ml 1/15 M Na_2HPO_4-Lsg. pH 6,7).
5. Spülen in aqua dest.
6. Trocknen (Föhn) und mit Eukitt eindeckeln.

C - banding:

1. Vorbehandlung (wie beim G-banding)
2. Hydrolyse:
   1 Std. in o,2 n HCl (2o ml 1 n HCl auf 8o ml aqua dest bei Raumtemperatur, mit aqua dest. gut spülen,

3. Denaturierung:
   Die Präparate (frisch, 1 und 2 Tage alt) 15 sec bei 5o°C in 5% $Ba(OH)_2$-Lösg. geben (5 g $Ba(OH)_2$ auf 1oo ml aqua dest., gut gesättigte Lsg., vor Gebrauch filtriert).
4. Renaturierung:
   1 Std. in 2 SSC-Lsg. bei 6o° C (2o ml 1o SSC-Lsg. auf 8o ml aqua dest.)
5. Färbung:
   1/2 - 1 Std. in 2 Vol.% Giemsa (2 ml Giemsa (Merck 92o4) auf 1oo ml aqua dest.)
   Abspülen in aqua dest., lufttrocknen, in Eukitt eindeckeln.

Ansatz der 1o-fach SSC-Lsg.:

Stammlsg.A: 87,675 g NaCl ad 1ooo ml aqua dest.

Stammlsg.B: 44,115 g $C_6H_5Na_3O_7$ 2 H_2O (Na-Citrat) ad 1ooo ml aqua dest.

Gleiche Volumina Stammlsg. A und B zusammengeben und mit 1 n NaOH auf pH 7,o einstellen.

C-T-banding:

1. Vorbehandlung: (wie beim Giemsa-banding)
2. Denaturierung:
   Präparate (frisch, 1 und 2 Tage alt) 25-45 sec in o,5% gesättigte und filtrierte $Ba(OH)_2$-Lsg. (pH 13, 4o C) geben.
   Gründliche Spülung in aqua dest.
3. Färbung:
   1o min in Stain-All Lsg. (o,o5% in 1:1 aqua dest. und Formamid, insgesamt 1oo ml, pH 8,2 mit 1 n NaOH einstellen).
   Dreimal in aqua dest. eintauchen, mit dem Föhn trocknen und mit Eukitt eindeckeln.

Zu beachten:

1. Die S.A. Lsg. ist lichtempfindlich.
2. Der pH der S.A.Lsg. muß laufend kontrolliert und

korrigiert werden, da er neutraler wird.

3. Die fertigen Präparate blassen unter Lichteinwirkung ab.

NOR-Darstellung:

0. Keine Vorbehandlung - die Präparate können bei Zimmertemperatur aufbewahrt werden.
1. 2 oder 3 Tage alte Präparate verwenden.
2. $AgNO_3$-Lsg. kurz vor dem Färben ansetzen (5o w/v%ige Lsg. z.B. 1 g auf 2 ml aqua dest., pH 4,5 - 5 (hierzu aqua dest. ca. 1 Std. vorher im CO_2-Brutschrank bei 37 C inkubieren.)
3. Mittels einer Spritze 2-4 Tropfen aufgelöste $AgNO_3$-Lsg. über einen Milliporenfilter (o,2 n) auf die waagerecht gelegten Objektträger geben.
4. Sofort mit einem Deckglas abdecken (ohne Luftblasen).
5. Waagerecht in eine sogenannte feuchte Kammer legen und 72 Std. bei 37 C inkubieren.
6. Feuchte Kammer: z.B. eine große Glasschale mit Deckel feuchter Watte auf dem Boden und Glasstäbe darüber als Unterlage für die Objektträger.
7. Objektträger 2 min unter fließendem (Leitungs-)Wasser halten (Deckglas fällt ab) und mit aqua dest. nachspülen.
8. Gegenfärbung mit Giemsa (s. G-banding) 13-14 sec. mit einem Föhn trocknen, eindeckeln und sofort mikroskopieren, da es abblaßt.

R-banding:

1. Vorbehandlung:
   Frische Präparate (3o sec bei 25o C), bei älteren Präparaten keine Vorbehandlung.
2. Färbung:
   4 Tropfen Chromomycin A_3 auf das Präparat auftropfen, Deckglas auflegen und 9o-12o min (frische, 1 und 2 Tage alte Präparate) in eine dunkle Schale liegen lassen.
   Objektträger je 1 min in 2 Kuvetten mit Sörensonpuffer

(pH 6,7) spülen.

3. Gegenfärbung:
   Methylgrün Gebrauchslösung (2-3 ml) für 4 min auf den Objektträger geben. Farbe abschütteln, zweimal in Glycerin (Merck)tauchen, Glycerin abschütteln und Deck - glas draufgeben (luftblasenfrei).

Ansatz der Gebrauchslösungen:

1. Chromomycin A_3: 1 mg (Sigma) in 2 ml Sörensonpuffer, pH 6,7 (wie beim G-banding) ca. 1 Std. unter Bewegung lösen.
2. Methylgrün: 2o mg (Sigma) in 3o ml Puffer, pH 4,2 (o,o1 M NaAC und o,o1 M NaCl, 1+1) lösen, dazu 3o ml Hepes Puffer, pH 7 (o,1 M Hepes (Gibco) und o,1 M NaCl, 1+1, pH mit 1 n HCl einstellen) geben.

Zu beachten: Die Farblösungen sind lichtempfindlich.

Q - banding:

1. Vorbehandlung:
   Frische Präparate (3o sec bei 25o C), sonst keine Vorbehandlung.
2. Färbung:
   In Quinacrin-Mustard Gebrauchslsg. für 5 min (5 mg QM, Sigma, in 1o5 ml aqua dest., 4 C).
3. Kurzes Spülen in Sörenson's Phosphatpuffer, pH 6,7 (s. 4.2.1.).
4. Trocknen des Objektträgers zwischen 2 Kleenextüchern (vorsichtig!)
5. Einlagerung in einer (1+1) Mischung von Glycerol und Sörensonphosphatpuffer, pH 6,7.

Zu beachten: Die große Lichtempfindlichkeit des QM.

Nach Adaption der wesentlichen Bänderungsverfahren an die "Pipettenmethode" kann diese Technik innerhalb der pränatalen Diagnostik routinemäßig eingesetzt werden.

8. L I T E R A T U R

AARHUS UNIVERSITÄT — Institute for Human Genetics: Persönliche Mitteilung (198o)

ALFI, O., et al.: — Chromosome Polymorphism and Prenatal Diagnosis Lancet 5: 1253 (1975)

ARRIGHI, F.E. HSU, T.C.: — Lokalization of Hererochroma-- tin in Human Chromosomes Cytogenetics 1o: 81-6 (1971)

BISHUN, N., et al.: — Induction of Chromosome Abnormalities by Reversal of Colcemid Inhibition in Leucocyte Cultures Specialia 8: 943-4 (1971)

BLOOM, S.E. and GOODPASTURE, C.: — An Improved Technique for Selective Silver Staining of Nucleolar Organizer Regions in Human Chromosomes Human.Genet. 34: 199-2o6 (197

BOBROW, M.: — Acridine Orange and the In- vestigation of Chromosome Banding Cold Spring Harbor. Symp. Quant. Biol., 38: 435-44o (1973)

BROWN, T. et al.: — Individual Variation of Centri Heterochromatin in Man. Hum. Genet. 55: 367-373 (198o)

BUCKTON, K.E. et al.: — C- and Q-band Polymorphisms in the Chromosomes of three Human Population. Ann. Hum. Genet., Lond. 4o: 99-112 (1976)

BURKHOLDER, G.D.: — The Ultrastructure of G- and C-Banded Chromosomes Exp. Cell. Res. 9o: 269-278 (1975)

CAMARGO, M. and CERVENKA, J.: Pattern of Chromosomal Replication in Synchronized Lymphocytes. I. Evaluation and Application of Methotrexate Block. Hum.Genet. 54: 47-53 (198o)

CASPERSSON, T. et al.: Identification of Human Chromosomes by DNA-Banding Fluorescent Agents Chromosoma, 3o: 215-7 (197o)

CLAUSSEN, U.: The Pipette Method: A New Rapid Technique for Chromosome Analysis in Prenatal Diagnosis. Hum. Genet. 54: 277-8 (198o)

COMINGS, D.E. et al.: The Mechanism of C- and G-Banding of Chromosomes. Exptl. Cell. Res. 77: 469-493 (1973)

COMINGS, D.E.: Mechanisms of Chromosomes Banding and Implications for Chromosome Structure. Ann. Rev. Genet. 12: 25-46 (1978)

COURTLAND WHITE, J.: Recent Concepts on the Mechanism of Action of Methotrexate. Cancer Treat. Rep. 65, Suppl. 1: 3-11 (1981)

CRAIG-HOLMES, A.P. et al.: Polymorphism of Human C-Band Heterochromatin I. Frequency of Variants. Amer. J. Hum. Genet. 25: 181-192 (1973)

CHAPELLE, A. de la, et al.: Differences in DNA Composition along Mammalian Methaphase Chromosomes. Chromosoma (Berl.), 42: 365-382 (1973)

DUTRILLAUX, B. and LEJEUNE, J.: Sur une nouvelle technique d analyse du caryotyoe humain. C.R. Acad. Sci., Paris 272: 2638-264o (1971)

DUTRILLAUX, B. et al.: Mise en évidence de la structu fine des chromosomes humains par digestion enzymatique (pronase en particulier) C.R. Acad. Sci., Paris 273: 587-8 (1971)

DUTRILLAUX, B.: Nouveau système de marquage chromosomique Les bandes T Chromosoma (Berl.), 41: 395-40 (1973)

DUTRILLAUX, B. and COVIC, M.: Étude de facteurs influencant la dénaturation thermique ménagée des chromosomes. Exp. Cell. Res. 85: 143-153, 1

DUTRILLAUX, B. and VIEGAS-PEQUIGNOT, E.: High Resolution R-banding and G-banding on the same Preparation. Hum. Genet. 57: 93-5 (1981)

EIBERG, H.G.: G, R and C Bands Patterns of Human Chromosomes produced by Heat Treatment in Organic and Inorganic Salt Solutions. Clin. Genet. 4: 556-562 (1973)

EPPLEN, J,T. et al.: DNA Replication Patterns of Human Chromosomes of Fibroblasts and Amniotic Fluid Cell Revealed by a Giemsa Staining Technique. Cytogenet. Cell. Genet. 15: 177-185 (1975)

FORD, C.E. and HAMERTON, J.L.: The Chromosomes of Man. Nature, Lond. 178: 1o1o-1923 (1956)

FRIEDLAND, A. BRENT, T.P.: DNA Replication in MTX-treated Human Lymphoblasts. Eur. J. Biocg., 57: 379-385 (1

GOODPASTURE, C., BLOOM, S.E.: Visualizytion of Nucleolar Organizer Regions in Mammalian Chromosomes Using Silver Stain Chromosoma, 53: 37-5o (1975)

HERMANN, K-: Untersuchungen zur Standardisierung der "Pipettenmethode", einer neuen, zeitsparenden Methode zur Chromosomenpräparation in der Pränataldiagnostik. Inst. für Humangen., Dissertation (1981)

HEROLD, G. et al.: Innere Medizin, S. 48, 1981 Verlag Aku Köln, Fotodruck

HOEHN, et al.: Cultivated Cells of Diagnostic Amniocentesis in Second Trimester Pregnancies. I. Clonal Morphology and Growth Potential. Ped. Res., 8: 756-764 (1974)

HOEHN, et al.: Cultivated Cells of Diagnostic Amniocentesis in Second Trimester Pregnancies II. Cytogenetic Parameters as Functions of Clonal Types and Preparative Technique. Clin. Genet. 7: 29-36 (1975)

HOWELL, W.M. et al.: Differential Staining of the Satellite Regions of Human Acrocentric Chromosomes. Experientia (Basel), 31: 26o-2 (1975)

ISCN (1978): An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (1978) Cytogenet. Cell. Genet. 21: 3o9-4o4 (1978)

JACOBSON, C.B. and BARTER, R.H-: Intrauterine Diagnosis and Management of Genetic Defects. Am. J. Obst. 15: 796-8o7 (1967)

JERSMANN, H.: In Preparation Düsseldorf, 1983

JOTTERAND-BELLOMO, M. and MELLE van G.: Variability of the Nucleolar Organizer Activity in Human Lymphocytes via Ag-Staining. Hum. Genet. 59: 141-7 (1981)

KNÖRR-GÄRTNER, H. and HÄRLE, J.: A Modified Method of Cultering Human Amniotic Fluid Cells for Prenatal Detection of Genetic Disorders. Humangenet. 14: 333-4 (1972)

LATT, S.A.: Optical Studies of Metaphase Chromosome Organization Ann. Rev. Biophysics Bio-engineering, 5: 1-37 (1976)

LATT, S.A.: Persönliche Mitteilung (1981)

LONDON CONFERENCE ON THE NORMAL CARYOTYP (1963) Cytogen., 2: 264-8 (1963)

MATSUI, S. and SASAKI, M.: Differential Staining of Nucleolus Organizers in Mammalian Chromosomes. Nature, 246: 148-15o (1973)

MEUTH, M. and GREEN,H.: Induction of a Deoxycytidinele Stade in Cultured Mammalian Ce by BrdU. Cell, 2: 1o9-112 (1974)

MC KENCIE, W-H. and LUBS, H.A. Human Q and C Chromosomal Vari tions: Distribution and Incice ce. Cytogenet. Cell Genet., 14: 97-115 (1975)

MILLER, D.A. et al.: Suppression of Human Nucleolus Organizer Activity in Mouse-Human Somatic Hybrid Cells. Exp. Cell. Res., 1o1: 235-243 (1976)

MOORHEAD, P.S. et al.: Chromosome Preparation of Leucocytes Cultered from Human Periphered Blood. Exp. Cell. Res. 2o: 613-6 (196o

MUELLER, G.C.: Biochemical Perspectives of the G 1 and S Intervals in the Replication Cycle of Animal Cel A Study in the control of Cell Growth. in: The Cell Cycle and Cancer (R. Baserga. ed.), pp. 269-3o7 New York Marcel Dekker, Inc., (1971)

NADLER, H.L.: Antenatal Detection of Genetic Disorders Pediatrics, 42: 912-917 (1968)

NADLER, H.L. and GERBIE, A.B.: Role of Amniocentesis in the Intrauterine Detection of Genetic Disorders. New Engl. Jour. of Med., 282: 596-9 (197o)

NIIKAWA, N. and KAJII, T.: Sequential Q- and Acridine Orange-Marker Technique Humangenetic, 3o: 83-9o (1975)

OLERT, J., et al.: Cytological and Histochemical Studies on the Mechanism of the Selective Silver Staining of Nucleolus Organizer Regions (NORs) Histochemistry, 6o: 91-9 (1979)

PAI, G.S. and THOMAS, G.H!: A New R-banding Technique in Clinical Cytogenetics. Hum. Genet. 54: 41-5 (198o)

PARIS-CONFERENCE (1971): Standardization in Human Cytogenetics. Cytogenetics, 11: 315-362 (1971)

PARIS-CONFERENCE (1971): Supplement (1975) Standardization in Human Cytogenetics. Birth Defects: Original Article Series, XI, 9, 1975. The National Foundation, New York

RIGLER, R.: Microflurometric Characterization of intracellular Nucleic Acids and Nucleoproteins by Acridine Orange. Acta Physiol. Scand. (Suppl.) 67: 3-122 (1966)

SAHAR, E. and LATT, S.A.: Enhancement of Banding Patterns in Human Metaphase Chromosomes by Energy Transfer. Proc. Nat. Acad. Sci. USA Vol. 75, Nr. 11: pp 565o-54 (1978)

SCHEMPP. W. and VOGEL, W.: Decrease of DNA Synthesis in Amniotic Fluid Cells during the Middle Part of S-Phase Revealed by Differential Chromosome Staining after Incorporation of BrdU. Chromosoma (Berl.) 67: 193-9 (1978)

SCHEMPP, W. et al.: Demonstration of Replication Patterns Corresponding to G- and R-type Banding of Chromosomas after Partial Synchronization of Cell Cultures with BrdU or dT Surplus. Hum. Genet. 45: 199-2o2 (1978)

SCHERES, J.M.J.C.: Production of C and T Bands in Human Chromosomes after Heat Treatment at High pH and Staining with "Stains-All" Humangenetik, 23: 311-4 (1974)

SCHERES, J.M.J.C.: CT Banding of Human Chromosomes. Description of the Banding Technique and Some of its Modifications. Hum. Genet. 31: 293-3o7 (1976)

SCHMID, W.: A Technique for In - Situ Karyotyping of Primary Amniotic Fluid Cell Cultures. Humangenetic., 3o: 325-33o (197

SCHMID, W.: Cytogenetical Problems in Prenatal Diagnosis. Hereditas 84: 37-44 (1977)

SCHOLLMAYER, E.: High Resolution Analysis and Differential Condensation in RBA- Banded Human Chromosomes. Hum. Genet. 59: 187-193 (1981)

SCHWARZACHER, H.G. The Nature of the Ag-Staining of Nucleolus Organizer Regions: Electron- und Lightmicroscopic Studies on Human Cells in Interphase, Mitosis and Meiosis Cytogenet. Cell. Genet. 2o: 24-39) (1978)

SCHWEITZER, D.: Counterstain-Enhanced Chromosome Banding
Hum. Genet. 57: 1-14 (1981)

SEABRIGHT, M.: A Rapid Banding Technique for Human Chromosomes
Lancet, 2: 971-2 (1971)

SEHESTED , J.: A Simple Method for R Banding of Human Chromosomes, Showing a pH-Dependent Connection between R and G Bands
Humangenetik, 21: 55-8 (1974)

SIT, K.H.: Three Levels of G-Band Differentiation.
Clinical Genetics, 18: 65-78 (198o)

STEELE, M.W. and BREG, W.R.: Chromosome Analysis of Human Amniotic Fluid Cells.
Lancet 1: 383-5 (1966)

STENGEL-RUTKOWSKI, S. et al.: Routine G-Banding in Prenatal$ Diagnosis of Chromosomal Disorders
Hum. Genet. 31: 231-4 (1976)

STENGEL-RUTKOWSKI, S. et al.: Die Chromosomenbanden: Bedeutung für Klinik und zytogenetische Forschung.
Münch. med. Wschr. 118 Nr. 19: 595-6o8 (1976)

STUBBLEFIELD , E.: Synchronization Methods for Mammalian Cell Cultures
Methods Cell Physiologie 3: 25-43 (1968)

STUTZ, R.: In Preparation
Düsseldorf (1983)

SUMNER, A.T.: Involvement of Protein Disulphides and Sulphydryls in Chromosome Banding
Exptl. Cell. Res., 83: 438-442 (1973)

SUMNER, A.T.: A Simple Technique for Demonstrating Centromeric Hererochromatin Exp. Cell. Res. 75: 3o4-6 (1972)

TAYLOR, E.W.: The Mechanism of Colchicine Inhibition of Mitosis
I. Kinetics of Inhibition and the Binding of 3-H-Colchicine
J. Cell. Biol. 25: 145-16o (196)

THERKELSEN, A.J. et al.: Experiences of Prenatal Genetic Diagnosis and Presentation of a Case of D/G Translocation Diagnosed in Utero.
Acta path. microbiol. scand., A 79: 211 (1971)

TJIO, J.H. and LEVAN, A.: The Chromosome Number of Man
Hereditas, 42: 1-6 (1956)

VALENTI, C. et al.: Culture of Cells Obtained by Amniocentesis.
J. Lab. and Clin. Med., 73; 355-8 (1969)

VERMA, R.S. and LUBS, H.A.: A Simple R-Banding Technic
Am. J. Hum. Genet. 27: 11o-7 (1975a)

VERMA, R.S. and LUBS, H.A.: Additional Observation on the Preparation of R Banded Human Chromosomes with Acridine Orange
Can.J. Genet. Cytol. 18: 45-5o (1976)

WYAMDT, H.E. et al.: Colored Reverse-Banding of Human Chromosomes with Acridine Orange following Alkaline/Formalin Treatment: Densitometric Validation and Applications
Humangenetik, 23: 119-13o (1974)

YUNIS, J.J.: New Chromosome Techniques in the Study of Human Neoplasia
Human Pathology, Vol. 12, No. 6: 54o-9 (1981)

YUNIS, J.J. et al.: The Charakterization of High-Resolution G-Banded Chromosomes of Man
Chromosoma (Berl,) 67: 293-3o7 (1978)

YUNIS, J.J. et al.: G-Banding Patterns of High-Resolution Human Chromosomes G 22, X and Y.
Hum. Genet. 49: 291-3o6 (1979)

Herrn Priv. Doz. Dr.med. habil.
Uwe C l a u s s e n danke ich für
seine wertvolle Unterstützung und
für die freundliche Überlassung des
Themas.

L e b e n s l a u f :

Am 31. Januar 1958 wurde ich als einzige Tochter des Studiendirektors Dr. H. Schmidt und seiner Gattin Jacqueline, geb, Bruyne und gebürtige Pariserin, in Düsseldorf geboren. Ich erhielt die doppelte Staatsangehörigkeit und wurde zweisprachig erzogen.

Von 1964 - 1967 besuchte ich die Volksschule und wechselte 1967 zum Goethe-Gymnasium in Düsseldorf über. Hier legte ich im Sommer 1976 die Reifeprüfung ab.

Im Oktober 1976 begann ich das Studium der Medizin an der Universität Düsseldorf und bestand im August 1978 die ärztliche Vorprüfung.
Im August 1979 legte ich das erste Staatsexamen ab und erhielt ein Auslandsstipendium der Deutschen Studienstiftung, um ein Jahr in Frankreich (Montpellier) zu studieren.
Im Oktober 198o kehrte ich nach Düsseldorf zurück, inzwischen endgültig in die Studienstiftung aufgenommen.
Im Frühjahr 1981 begann ich im Institut für Humangenetik und Anthropologie der Universität Düsseldorf mit den Untersuchungen zur Anpassung der herkömmlichen Bänderungstechniken an die "Pipettenmethode".